UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1937 — 1938 N° 190

Étude d'un Bacille isolé d'un pus d'abcès dentaire: Bacillus violaceus et de son pigment : la violacéine cristallisée.

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 9 Mai 1938
à la FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention PHARMACIE)

par

JOSEPH WAELDELE

Examinateurs de la Thèse :

MM. A. SARTORY, *Professeur, Président*
P. CORDIER, *Professeur*
R. SARTORY, *Professeur*

IMPRIMERIE „HORO" STRASBOURG
S. à r. l.
10, Rue du Faisan
1938.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548002_0067

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1937 — 1938 N° 190

Étude d'un Bacille isolé d'un pus d'abcès dentaire: Bacillus violaceus et de son pigment: la violacéine cristallisée.

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 9 Mai 1938
à la FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention PHARMACIE)

par

JOSEPH WAELDELE

Examinateurs de la Thèse:

MM. A. SARTORY, *Professeur, Président*
P. CORDIER, *Professeur*
R. SARTORY, *Professeur*

IMPRIMERIE „HORO" STRASBOURG
S. à r. l.
10, Rue du Faisan
1938.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. A. SARTORY, *Doyen*, C. ✻, I. ✿, C. ❁
VOLMAR, *Assesseur*
CUVIER, *Secrétaire*, I. ✿

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

DOYEN HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✿, ❁

PROFESSEURS

MM.	A. SARTORY, C. ✻, I. ✿, C. ❁	Bactériologie
	LAVIALLE, ✻, I. ✿, ❁	Botanique
	VOLMAR, I. ✿	Chimie organique
	GUILLAUME, ✻, ⚕, I. ✿, ❁	Pharmacie galénique
	LAPP, I. ✿	Chimie analytique
	CORDIER, ✿	Pharmacie chimique
	R. SARTORY, ✿	Matière médicale

PROFESSEUR HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✿, ❁

COURS COMPLEMENTAIRES

MM.	A. SARTORY	Hygiène
	LAVIALLE	Hydrologie
	VOLMAR	Chimie minérale
	GUILLAUME	Zoologie
	LAPP	Physique
	EISENMANN	Législation et Déontologie
	CORDIER	Chimie biologique
	R. SARTORY	Cryptogamie
	DUQUENOIS	Toxicologie

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	R. SARTORY	Bactériologie et Parasitologie
	COLLARD, I. ✿, ⚕	Chimie pharmaceutique
	BOHN, A. ✿	Histoire naturelle
	DUQUENOIS	Chimie et Physique

A mon Maître et Président du Jury de ma Thèse:

M. le Doyen A. SARTORY

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg,

Commandeur de la Légion d'honneur.

Témoignage de respectueuse reconnaissance.

A MES JUGES:

P. CORDIER, Professeur.

R. SARTORY, Professeur.

Hommage de profonde gratitude.

A MES PARENTS

En profonde et sincère reconnaissance.

A MES AMIS

En Souvenir des bonnes années passées ensemble à la Faculté.

Introduction.

Le monde végétal et le monde animal présentent une variété de couleurs, qui a depuis longtemps attiré l'attention des naturalistes après celle des artistes.

L'apparition de certaines colorations, le changement de teinte des eaux, des matières alimentaires courantes, comme le pain et le lait, avant que d'être rapportés à l'influence de microorganismes, avaient trouvé depuis l'antiquité jusqu'au siècle de Pasteur les explications les plus diverses. Mais les causes et la nature intime de ces phénomènes sont encore loin d'être connues. Ces différentes couleurs observées sont dues soit à des structures physiques particulières, soit pour le plus grand nombre à des corps naturellement colorés et chimiquement définis — ce sont les pigments proprement dits.

Depuis les travaux des premiers bactériologistes et chimistes, l'étude des bactéries chromogènes a marqué un temps d'arrêt. Puis vers la fin du dix-neuvième siècle, un grand nombre de recherches ont été entreprises pour éclaircir à la fois la biologie des bactéries chromogènes et le rôle des pigments bactériens.

Malheureusement les différents auteurs ne donnent souvent que des descriptions très brèves de l'aspect macroscopique des cultures, et les caractères morphologiques des microorganismes sont à peine mentionnés, tandis que pour la plupart les propriétés biologiques et biochimiques font encore complètement défaut. Il en résulte fatalement une grande confusion dans la comparaison des différentes espèces et surtout la création quelquefois insuffisamment justifiée d'espèces toujours nouvelles.

La substance chromogène recevait de ce fait les noms les plus fantaisistes, sans même avoir été obtenue à l'état de

pureté, c'est-à-dire cristallisé. Dans les différents compte-rendus, publiés à ce sujet, les auteurs se sont efforcés à étudier les caractères de solubilité, les propriétés tinctoriales, l'influence des acides et des bases, des réducteurs et des oxydants, des réactifs les plus divers de la chimie sur les matières colorantes retirées des microorganismes. Ils essayaient ainsi de caractériser le pigment ou du moins de le classer dans un groupe de colorants déjà connus. Depuis, de nouveaux moyens d'investigations sont venus faciliter et perfectionner les recherches de ce genre. Le progrès de la chimie-physique, l'analyse spectrale, c'est-à-dire les techniques spectroscopiques dans le domaine des radiations visibles, la spectrophotométrie pour les radiations ultra-violettes sont maintenant d'un usage courant et forment le complément nécessaire de l'étude d'une matière colorante. Formaneck, Grandmougin et Hartley furent les grands précurseurs de ces méthodes. Ces moyens nouveaux furent largement utilisés, mais malheureusement trop souvent sur des matières colorantes impures, non cristallisées. Les résultats, d'ailleurs souvent contradictoires, n'ont dès lors qu'une valeur relative, et c'est probablement cette difficulté de faire cristalliser les pigments bactériens qui a retardé si longtemps les auteurs.

Cependant, il faut citer les travaux de Fordos et de Gessard sur la Pyocyanine, retirée de Bacillus Pyocyaneus. Fordos fut le premier à isoler une matière colorante bactérienne à l'état cristallisé. Viennent ensuite les excellents travaux de M. le Professeur Ph. Lasseur sur la Chlororaphine, les aiguilles vertes des cultures de Bacillus Chlororaphis G. et S. Scheurlen, Rosenberg, Molisch, apportent des résultats nouveaux quant à l'étude des Bacilles rouges, les «Purpurbacillen». Plus récemment, c'est l'école de Willstaetter, qui, après de longues et patientes recherches, est venue nous fournir des données nouvelles sur les problèmes biologiques et biochimiques des bactéries chromogènes. Enfin, de 1929 à 1933, Wrede et ses collaborateurs ont isolé et réalisé la synthèse de la Prodigiosine, produite par Bacillus Prodigiosus; Kögl et ses élèves ont déterminé la formule chimique et réalisé la synthèse de la Chlororaphine.

La plupart de ces pigments ont donc été identifiés chimiquement; la plus grande difficulté est toujours de les obtenir en quantité suffisante, car la microanalyse n'est pas encore d'un usage courant.

L'origine et le rôle de ces substances colorantes bactériennes sont encore fort obscurs. Il n'y a guère que les mélanines, qui dérivent par oxydation du tryptophane, dont l'origine soit établie avec certitude. Quant aux rôles attribués aux pigments, ils ont été des plus divers: les uns y voient des produits de désassimilation, les autres des stades intermédiaires de l'attaque des produits quaternaires. Tout récemment enfin on attribue à certains le rôle de pigments respiratoires. Leur importance biologique est certaine et nous ne retiendrons que les travaux de Ernst A. H. Friedheim, sur les fonctions respiratoires des pigments microbiens.

Nous inspirant de toutes ses idées, nous avons cru bien faire d'orienter nos travaux vers ces questions, et nous pensons, en présentant aujourd'hui les résultats de nos recherches sur Bacillus Violaceus n. sp. Sartoryi et de son pigment la Violacéine, apporter une contribution nouvelle et des données précises dans l'étude des bactéries chromogènes.

Notre travail comprend deux grandes parties:

— dans la première partie nous envisagerons d'abord l'historique de la question et nous passerons en revue les travaux antérieurs relatifs aux microorganismes chromogènes. Puis nous résumons les recherches relatives au groupe des bactéries violettes; enfin un dernier chapitre expose l'état actuel de nos connaissances sur les pigments violets.

— la deuxième partie comprend les travaux relatifs à notre Bacille violet. Nous exposerons d'abord l'étude morphologique et biologique du bacille, ses caractères culturaux et ses propriétés biochimiques. Puis nous aborderons l'étude du pigment. Nous étudierons particulièrement les conditions de production du pigment violet, son extraction spéciale, sa purification, l'étude de ses propriétés physiques et chimiques, enfin les résultats de l'analyse spectrale. Quelques considérations générales sur l'origine et le rôle du pigment termineront notre exposé.

Ce travail a été conçu et élaboré dans les Laboratoires de Bactériologie et de Cryptogamie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg. Que notre cher Maître, M. le Professeur A. Sartory, Doyen de la Faculté, nous permette de le remercier bien vivement et très sincèrement de l'accueil bienveillant et si cordial, qu'il nous a réservé. Sa haute

compétence et son expérience ont grandement facilité notre tâche. Nous tenons à lui exprimer toute notre reconnaissance.

Nous adressons également l'expression de notre gratitude à Monsieur P. Cordier et à Monsieur R. Sartory, Professeurs à la Faculté de Pharmacie, qui ont accepté tous deux de faire partie de notre jury de thèse. Notre reconnaissance et nos remerciements vont également M. J. Meyer, Assistant de M. le Professeur Sartory. Son amabilité, le grand intérêt qu'il a toujours porté à notre travail, ses conseils éclairés ainsi que ses encouragements et sa foi dans la réussite, nous furent d'une aide particulièrement précieuse.

En dehors de la Faculté, nos plus vifs remerciements vont à M. le Professeur Vlès, Directeur de l'Institut de Physique Biologique de la Faculté de Médecine de Strasbourg; grâce à son extrême obligeance, nous avons pu réaliser l'analyse spectrale de notre pigment et en tirer les conclusions les plus utiles.

PREMIERE PARTIE.

Historique.

Chapitre premier.

Les principales bactéries chromogènes et leurs pigments.

Les premiers travaux parus à ce sujet semblent être les études biologiques effectuées par le vénitien Bartolomeo Bizio (1) en 1819 sur Bacillus Prodigiosus. Plus tard, en 1869, Fordos (2) isole pour la première fois la substance chromogène produite par Bacillus Pyocyaneus. Il signale que cette matière colorante se comporte comme un véritable alcaloïde. Mais c'est seulement dans les dix dernières années du siècle précédent, que l'étude des bactéries chromogènes a fait de grands progrès.

Toutes les bactéries chromogènes peuvent être divisées en deux grands groupes: d'une part celles dont le contenu cellulaire seul est coloré, et d'autre part les bactéries, qui secrètent un pigment dans le milieu ambiant, mais dont le corps bactérien reste invariablement incolore. Beijerinck (10) a appelé ce dernier groupe «bactéries chromopares» tandis que les formes, où le colorant reste inclus dans le corps microbien sont appelées «bactéries parachromopares». Nous voyons immédiatement que nous avons à faire à deux catégories de colorants, les uns solubles dans l'eau et les autres insolubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants organiques.

Le terme de «bacilles lipochromes» réunissait autrefois tous les organismes bactériens secrétant des pigments associés aux lipides, appelés pigments lipidiques ou encore chro-

molipoïdes. C'était un groupe très hétérogène. Certains de ces pigments sont simplement dissous dans le lipide, qu'ils colorent, d'autres représentent le lipide lui-même. Comme le fait remarquer J. Verne (11), les chromolipoïdes ou lipochromes, dignes de ce nom, sont des substances colorées, directement formées aux dépens de lipides, dont ils ont la constitution générale. Le pigment n'est pas simplement fixé à un substratum gras, il est le corps gras lui-même. Dès lors il devient très difficile de maintenir encore aujourd'hui le terme de bacilles lipochromes et cela tant que l'origine des pigments bactériens ne sera pas mieux connue.

D'autres classifications des germes chromogènes ont été entreprises, mais toutes ont échoué, vu le grand nombre et la diversité de ceux-ci. Le plus simple est de rapprocher les germes secrétant des pigments semblables dans un même groupe. C'est ce que firent Lasseur et ses collaborateurs (12) pour les bacilles bleus et violets. Malheureusement nos connaissances ne sont pas toujours suffisantes pour établir à l'intérieur de ces groupes un ordre et une clarté parfaite et toute classification s'évanouit devant des descriptions souvent très sommaires de telles ou telles bactéries voisines, secrétant un pigment de même couleur.

L'étude chimique et l'isolement à l'état pur cristallisable des substances chromogènes n'ont pu être réalisés que dans ces toutes dernières années, si bien que jusqu'à présent seuls les pigments suivants ont été obtenus à l'état pur cristallisé:

Fordos isole la *pyocyanine*, Wrede et Strack (3) en 1929 en établissent la formule et la synthèse.

Lasseur (4), qui a étudié de nombreux pigments bactériens, obtient en 1911 la *chlororaphine* produite par B. Chlororaphis G. et S. Kögl (5) en établit la formule et en réalise la synthèse. Eléma (6) en étudie le potentiel oxydo-réducteur et Dhéré, en 1931 (7), publie une étude fluoroscopique de la chlororaphine et de ses dérivés.

Wrede et son Ecole en 1929 (8) obtiennent la *prodigiosine* à l'état cristallisé, en établissent la synthèse quelques années plus tard.

En 1930, dans les Laboratoires de cette Faculté, J. Sevenet (9) a pu isoler à l'état cristallisé et déterminer la formule chimique du pigment secrété par Bacillus Citrulli Sartoryi.

A) BACILLUS PRODIGIOSUS.

Les travaux fondamentaux sûr Bacillus Prodigiosus ont été effectués, en respectant l'ordre chronologique, par Bartolomeo Bizio en 1819, Erdmann (13) en 1866, Schrœtter (14) en 1875, Griffiths (15) en 1892, Scheurlen (16) et Schottelius (17) de 1887 à 1896, Schneider (18) en 1888 et Rosenberg (19) en 1897. Enfin en 1902 paraît l'important mémoire de Kraft (20).

Caractères culturaux:

A la suite de ces recherches, on a distingué jusqu'à sept variétés différentes du Bacillus Prodigiosus. C'est un bâtonnet de dimensions inférieures à 1 μ, mobile, sans spores. Les cultures en tubes de bouillon produisent un trouble puis des flocons. Il réussit bien sur gélatine en plaques; sur gélatine en piqûre, il se développe en entonnoir, en surface et en aiguille. Sur pomme de terre il forme un enduit luxuriant. C'est un anaérobie facultatif.

Propriétés biochimiques:

Il liquéfie la gélatine et le sérum coagulé, mais ne redissout pas la caséine.

A +37° C. il fermente, avec production de gaz, le glucose, et sans gaz, le lactose et le saccharose. Il réduit les nitrates, ne produit pas d'indol, acidifie et coagule le lait.

Pigment.

Le pigment secrété par le bacille est exclusivement retenu dans le corps bacillaire en forme de petites gouttelettes solubles dans les lipides. En 1902, Kraft, étudie les propriétés chimiques sommaires du pigment; en 1927, Lasseur et Girardet (21) ont repris l'étude du pigment. Ces

auteurs n'ont pas obtenu un pigment cristallisé pur. Ils avaient employé pour l'extraction, l'alcool à 95° et l'éther. Finalement, ils avaient obtenu une masse brun-rougeâtre, à reflets métalliques, qu'ils purifient par la méthode capillaire. Cette substance permet aux auteurs de constater, que les pigments secrétés par les Bacilles Kiliensis et Prodigiosus paraissent identiques, grâce à leurs spectres d'absorption communs dans le visible.

Tout récemment, en 1929, les excellentes recherches de Wrede et Hettche (22) ont permis d'isoler pour la première fois, la prodigiosine à l'état cristallin. A cet effet, ces auteurs avaient ensemencé de grandes plaques d'agar-agar. En raclant ces cultures, ils obtenaient une espèce de gelée de corps microbiens. Comme le pigment est fixé sur le bacille, il faut détruire ces derniers par addition de lessive de soude diluée; les corps bactériens sont partiellement dissous. On agite bien le tout dans une ampoule à décanter avec de l'éther de pétrole. Le pigment passe dans l'éther de pétrole; on évapore et on purifie par dissolution dans l'alcool. Après une seconde évaporation, on redissout le pigment dans l'éther sulfurique anhydre, puis on précipite le chlorhydrate par un courant de gaz chlorhydrique sec. A partir de ce chlorhydrate, les auteurs ont obtenu les picrate, perchlorate et salicylate bien cristallisés, mais non le pigment lui-même.

Les déterminations du poids moléculaire, en solution acétique-alcoolique, ne donnèrent pas de résultats concordants. L'analyse élémentaire de la substance pure se montra difficile, car elle ne brûle pas facilement. Les valeurs trouvées correspondent à:

$$C^{20}H^{25}N^{3}O.$$

Comme le précieux pigment, par les méthodes de destruction habituelles, ne donnait pas de produits caractéristiques, Wrede et Hettche ont pensé à l'analyse spectroscopique d'après Formaneck, pour essayer de classer le pigment dans l'une ou l'autre catégorie de colorants. Un échantillon envoyé à M. le Pr. Formaneck à Prague, a montré deux bandes d'absorption:

5375 Å.E. et 5010 Å.E.

pour le perchlorate de prodigiosine en solution alcoolique. Il en conclut que la prodigiosine n'a rien de commun avec un dérivé rosanilique.

Lasseur et Girardet ont également déterminé le spectre d'absorption dans le visible d'une prodigiosine non cristallisée, isolée par eux en 1927. Ces auteurs indiquent les maxima de Formaneck-Grandmougin suivants:

1re bande $\lambda = 537{,}5$

2e bande $\lambda = 498$

3e bande $\lambda = 457$

en solution alcoolique de concentration 390 mgr. 0/00 Ils observent donc une bande supplémentaire. Dans l'ultra-violet, Bac. Prodigiosus donne, selon les mêmes auteurs, deux bandes correspondant aux maxima de Formaneck-Grandmougin suivants:

1re bande $\lambda = 280$

2e bande $\lambda = 266$

pour une solution alcoolique de concentration: 250 mgr. 0/00. L'addition d'acide ou de base ne détermine pas de variations caractéristiques du spectre d'absorption.

Ces mêmes auteurs ont également examiné le spectre de l'oxychlororaphine réduite, pigment cristallisé, obtenu par réduction de la chlororaphine, isolée par Lasseur en 1911 (4) de cultures de Bac. Chlororaphis G. et S. de même que le spectre du pigment d'un Bacillus Violaceus. Malheureusement nous ne trouvons pas dans leurs travaux la description des caractères morphologiques, culturaux et biochimiques de ce bacille violet, que ces auteurs rangent provisoirement dans le groupe de Bac. Violaceus Macé. Nous reprendrons plus loin les excellentes recherches sur ces deux bacilles. Qu'il nous soit permis de citer dès à présent les comparaisons que Lasseur et Girardet tirent de leurs spectres d'absorption: «a priori, rien ne permet de rapprocher le spectre de la prodigiosine de celui du pigment violet. Cependant, nous constatons, que la prodigiosine et l'oxychlororaphine réduite ont une bande commune: $\lambda = 537{,}4$. Or, l'oxychlororaphine et le pigment violet offrent trois bandes identiques. Ainsi se trouve établi le rapprochement entre la prodigiosine et le pigment violet. D'ailleurs dans l'ultra-violet, la prodigiosine et le pigment violet ont encore deux bandes communes: $\lambda = 280$ et $\lambda = 266$».

En 1930, J. Sevenet (9) évrivait aussi en se basant sur ces

résultats qu'il n'est plus douteux aujourd'hui que la prodigiosine ne soit en parenté étroite avec l'oxychlororaphine. En comparant les formules globales à présent établies:

oxychlororaphine $C^{11}H^{11}N^3O$

prodigiosine $C^{20}H^{25}N^3O$

il semble que la prodigiosine soit un homologue supérieur de l'oxychlororaphine, et nous aurons par conséquent des pigments rentrant dans un même groupe de colorants, et rapprochant les Bacillus Chlororaphis, Bacillus Violaceus et Bacillus Prodigiosus. (*Tableau*).

MAXIMA DE FORMANECK-GRANDMOUGIN.

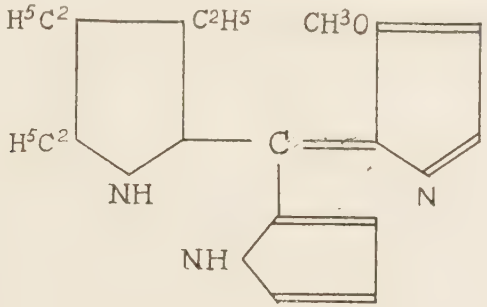
Pigment violet addit. d'SO^4H^2 solution bleue	Oxychlororaphine réduite solution verte	Prodigiosine sol. alcoolique sol. rge-violacée
1re Bande λ=704,8	1re Bande λ=704,8	
2e Bande λ=637,5	2e Bande λ=637,6	
3e Bande λ=586,8	3e Bande λ=587	
	1e Bande λ=537,4	1re Bande λ=537,4
		2e Bande λ=498
		3e Bande λ=457
4e Bande λ=280		4e Bande λ=280
5e Bande λ=266		5e Bande λ=266

Pigment violet: 2,6 mgr. de substance colorante % de solvant; solution alcoolique additionnée de 2 cm^3 d'acide sulfurique dit pur du commerce pour 100 cm^3 de liqueur.

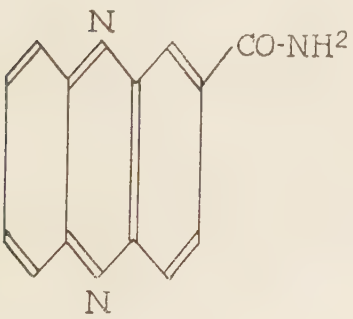
Oxychlororaphine réduite: 34,4 mgr. % d'acétone; la solution renferme aussi 8 cm^3 HCl % de liqueur.

Prodigiosine: pour les trois premières bandes: 39 mgr. % d'alcool; pour les deux dernières bandes: 250 mgr. % d'alcool.

Depuis, la prodigiosine a été isolée à l'état cristallisé, sa formule et sa synthèse ont été réalisées par les magnifiques travaux de Wrede et de son école. Ils ont donné la formule développée suivante:



Ce serait donc un dérivé du triphénylméthane. Comme nous le reprendrons ultérieurement, Kögl put, en 1932, établir la formule développée de l'oxychlororaphine ($C^{13}H^9N^3O$).



Nous voyons donc que la prodigiosine et l'oxychlororaphine n'ont rien de commun chimiquement. Et nous voyons aussi avec quelle extrême prudence, il faut interpréter les ressemblances quelquefois frappantes d'analyses spectroscopiques, pouvant certes offrir des analogies, voir même des points communs, sans cependant nécessiter une parenté quelconque entre les différents produits examinés.

B) BACILLUS PYOCYANEUS. Gessard 1882.

La bactérie du pus bleu n'est guère connue que sous le nom de Bacillus Pyocyaneus Gessard 1882. Elle a néanmoins été décrite par Schroetter (23) en 1872, sous le nom de Bacterium Aeruginosum. Migula (24) en 1900 l'a rangée dans son genre Pseudomonas et l'a désignée sous le nom de Pseudomonas Aeruginosa.

Caractères morphologiques.

Grâce aux travaux de Gessard, Radais (25) en 1897, Mamelle (26) en 1919, nous connaissons aujourd'hui trois types dans l'espèce Pyocyaneus. Ce sont les variétés pyocyanogène, mélanogène et érythrogène. Ces deux dernières secrètent sur eau peptonée respectivement un pigment noir et un pigment rouge.

Il se présente sous l'aspect d'un petit bâtonnet, mobile, aux extrémités arrondies, mesurant 1μ5 de long sur 0μ5 de large avec un cil vibratil spiralé à une extrémité. On n'a jamais trouvé de formes de conservation. Pas de spores.

Il ne prend pas le Gram.

Le bacille présente des variations morphologiques importantes: sur milieu avec 1‰ de créosote nous obtenons des formes en coccus; avec 7‰ d'acide borique des spirilles; des filaments avec bichromate de potasse, alcool et phénol.

Propriétés culturales:

Ce n'est pas un aérobie strict, mais en anaérobiose il ne produit pas de pigment. Il est facile à cultiver. Optimum cultural: + 35° à + 37° C.

Bouillon: trouble après 8 heures, puis une teinte verte se développe à la partie supérieure du milieu de culture. Il se

forme un voile blanc, qui se dessèche et tombe au fond. Les bacilles jeunes fournissent une culture blanche, qui verdit ensuite.

Gélose: milieu excellent. Développement de même.

Pomme de terre: enduit épais brunâtre. La partie de la pomme de terre sous-jacente raclée, bleuit ensuite.

Lait: Voile verdâtre, puis coagulation. Celle-ci est suivie d'une peptonisation.

Sérum coagulé: culture blanche, puis liquéfaction du sérum.

Blanc d'œuf: culture grêle blanche, puis verte; et lentement le tout se dissout.

Propriétés biochimiques.

Sucres: Les alcools polyatomiques, telle la glycérine, et les sucres: mannite, dulcite, saccharose, maltose, lactose et lévulose ne sont pas attaqués. Mais le glucose et le galactose sont attaqués.

Action réductrice: en gélose profonde réduit le rouge neutre, les nitrates en nitrites.

Pas de production d'H^2S, ni d'indol.

Grande activité protéolytique: gélatine, blanc d'œuf et sérum sont activement liquéfiés. Il produit également une hémolyse rapide.

Toxine: les cultures filtrées tuent le lapin. Le bacille est donc pathogène. L'animal de choix est le lapin.

Pigment:

«On ne peut guère étudier, dit Lasseur, le bacille Pyocyanique, sans évoquer immédiatement le nom de C. Gessard (27) et rappeler une partie des belles recherches de ce Savant». Mais Fordos et l'école allemande de Wrede (28) par leurs brillantes recherches sur la pyocyanine ont également attaché leur nom au bacille Pyocyanique..

Ce bacille peut produire quatre pigments: une substance bleue, la pyocyanine de Fordos, une substance fluorescente,

une matière colorante rouge et un pigment mélanique. La pyocyanine seule est spécifique et caractérise Bac. Pyocyaneus.

Gessard, en 1882, décrivait Bac. Pyocyaneus comme un germe donnant trois pigments: un gris-bleu, soluble dans le chloroforme; un verdâtre, insoluble dans le chloroforme et dans l'alcool, mais soluble dans l'eau, enfin un rouge-brun, qui n'a pu être caractérisé au début. Boland (29) en 1899, dans une étude plus approfondie reconnait deux pigments: l'un la pyocyanine, avec son dérivé la pyoxanthose et l'autre la fluorescéine. En ce qui concerne la pyoxanthose, cet auteur a supposé qu'elle était un dérivé de la pyocyanine. Il a constaté en effet, que sous l'action des substances réductrices le pigment bleu devient jaune-blanc. Si en solution chloroformique à l'air libre cette transformation s'effectue lentement, au soleil elle est rapide, par décomposition du chloroforme en chlore naissant très actif.

La substance, produisant la fluorescence verte, est soluble dans l'eau, mais insoluble dans l'alcool et le chloroforme. Bacillus Pyocyaneus n'est pas seul à la produire. Ainsi Bac. Fluorescens ne secrète que cette substance, d'autres au contraire, tels Bac. Le Monnieri, Bac. Chlororaphis, Bac. Caryocyaneus, Bac. Cyaneo-fluorescens, produisent en même temps un pigment bleu.

Extraction de la pyocyanine.

En 1860, Fordos isole à l'état cristallisé, sous forme de prismes ou d'aiguilles d'un beau bleu, le pigment du bacille du pus bleu. Il lui donne le nom de pyocyanine.

Elle rougit par les acides et vire de nouveau au bleu par les alcalis, tout comme le tournesol. Gessard en 1899, la rapproche des bases organiques. Les réducteurs la décolorent en formant un leuco-dérivé blanc. L'agitation à l'air fait réapparaître la teinte primitive.

L'extraction est basée sur la solubilité de la pyocyanine dans le chloroforme. Par évaporation de cette solution on obtient la pyocyanine cristallisée. Gessard note cependant que d'autres substances ont pu passer dans le chloroforme, d'où nécessité d'une purification. Dans ses études sur les pigments microbiens, Lasseur a repris le procédé Fordos-Gessard. Il évitait l'oxydation et la transformation partielle en pyoxanthose en effectuant les cristallisations dans le vide.

Nous n'insisterons plus sur ces procédés, car dans un travail récent, Wrede et Strack (28) ont pu isoler la pyocyanine en toute pureté. Ils ont enfin défini la constitution et la composition exacte de cette substance et finalement ils sont arrivés à réaliser sa synthèse. Nous allons décrire rapidement les travaux et les résultats de ces savants.

Pour un pH égal à 7,4 la production de pigment est maxima. La présence de 1% de peptone dans le milieu de culture est inutile. Il semble se produire une réduction du colorant, donnant naissance à un produit incolore, qui à l'air prend la teinte typique. L'extraction de la substance colorée a été effectuée à l'aide du chloroforme, comme dans le procédé Fordos-Gessard. Pour séparer le colorant de la solution chloroformique, la meilleure méthode est celle qui emploie l'acide picrique en solution chloroformique; le picrate formé précipite alors en fines aiguilles. Par cristallisation dans l'alcool absolu on peut alors l'obtenir à l'état de pureté. En décomposant ce picrate par un courant de gaz chlorhydrique, on obtient une solution de chlorhydrate de pyocyanine, qui donne de beaux cristaux par évaporation.

Analyse chimique.

A partir de ce chlorhydrate, on peut préparer de superbes cristaux de chloro-aurate et chloro-platinate, dont la formule globale est:

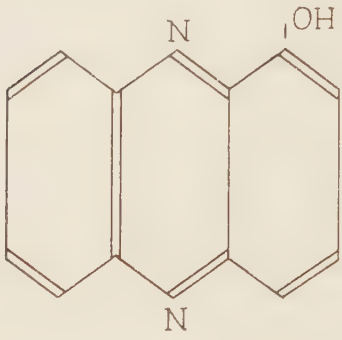
$$C^{26}H^{20}N^4O^2H^2PtCl^6.$$

Ledderhose (30) en 1888, indiquait: $C^{11}H^{11}N^2O$. Madinaveitia en 1916, proposait la formule: $C^{60}H^{59}N^{10}Cl^5O^3$. Ces deux formules sont donc à rejeter.

Le poids moléculaire a été déterminé dans l'acide acétique cristallisable. Il semble être 424.

Le colorant est très peu résistant à l'action des réactifs oxydants. Le permanganate de potassium et l'eau oxygénée détruisent la couleur en très peu de temps. La réduction aussi s'effectue très facilement par le glucose et l'hydrosulfite de sodium en solution alcaline. Par contact prolongé avec les acides dilués, la couleur de la pyocyanine se transforme en rouge vineux; il s'est formé un nouveau corps: l'hémipyocyanine. En préparant le chloroaurate de l'hémipyocyanine, les auteurs ont pu démontrer que la molécule de pyocyanine a

une constitution symétrique et que sa décomposition doit



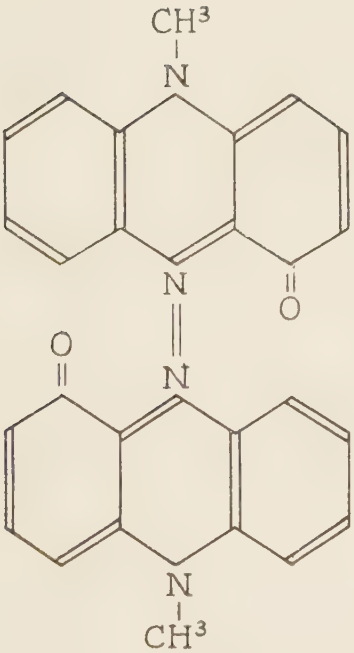
Hemipyocyanine = Oxyphénazine

s'effectuer sans fixation d'eau. La formule brute de ce sel est $C^{12}H^8N^2O$. La pyocyanine est basique, l'hémipyocyanine se comporte au contraire à la fois comme une base ou comme un acide, à peu près comme le phénol. Les auteurs ont pu réaliser par la suite la synthèse de l'oxyphénazine et démontrer son identité avec l'hémipyocyanine. Ainsi on a, pour la première fois, prouvé la production d'un dérivé de la phénazine comme produit de désassimilation d'un organisme vivant. Par quels moyens les bactéries arrivent-elles à fabriquer cette combinaison relativement très complexe? On n'a pu l'élucider jusqu'à présent.

En partant de la pyocyanine naturelle on peut isoler jusqu'à 80% du poids de l'hémipyocyanine ou α-oxyphénazine. Théoriquement il doit se former 98% de ce corps. Par ce fait il faut admettre qu'il existe dans la pyocyanine deux molécules de l'α-oxyphénazine préformée. En partant de cette théorie, au cours de laborieuses recherches, Wrede et ses collaborateurs ont obtenu, en chauffant l'α-oxyphénazine, avec le sulfate de méthyle une solution rouge, dont précipite par addition d'éther sec, un sel méthylo-sulfurique à cristaux brun-rouges, dont la formule est: $C^{13}H^{11}N^2O\ (SO^4CH^3)$.

Si l'on dissout ces cristaux dans l'eau en présence d'alcali, il se forme un corps, qui peut être extrait par le chloroforme. Cette substance est, d'après son aspect caractéristique, son point de fusion et les réactions analytiques, complètement identique à la pyocyanine naturelle. D'après ces recherches la formule de constitution de la pyocyanine est définitivement établie et correspond à

$C^{26}H^{20}N^4O^2$.



Pyocyanine

La pyocyanine est donc préparée synthétiquement et reconnue comme un dérivé de la phénazine. Elle est par conséquent à classer dans le groupe chromogène des indulines, des safranines et des indantrènes. Le processus de la synthèse biologique de la pyocyanine n'est pas encore établi, parce qu'on a de grandes difficultés à suivre le chemin que le bacille pyocyanique emploie pour construire, en partant de substances tellement dégradées que l'acide lactique et de substances minérales un corps d'une structure aussi complexe.

Enfin Wrede et Strack posent la question suivante: quel est le rôle incombant à ce colorant, qui absorbe et libère si facilement l'hydrogène, dans le métabolisme de son générateur ou de l'hôte sur lequel la bactérie vit en parasite? Quoiqu'il en soit, il est aujourd'hui démontré, que nous avons à faire ici à un pigment bactérien spécifique, totalement différent des pigments du Bac. Prodigiosus et du Bac. Chlororaphis.

Analyse spectrale.

Lasseur et Girardet (21) ont étudié le spectre de la pyocyanine. Ils se sont servis pour l'extraction de la pyocyanine de la méthode de Fordos-Gessard. Ces mêmes auteurs ont réussi à préparer par cristallisation lente dans le vide un chlorhydrate de pyocyanine stable en solution aqueuse, toujours additionnée d'un peu d'acide chlorhydrique pour éviter la décomposition toujours possible en pyocyanine.

Dans la partie visible du spectre l'absorption de la pyocyanine base est peu caractéristique. La concentration est de 17,6 mgr. % d'alcool. La solution à examiner est bleue et additionnée de quatre gouttes d'NH^3 pour 100 cm^3 d'alcool.

Le spectre du chlorhydrate de pyocyanine est plus caractéristique. Il présente une bande d'absorption asymétrique à bord gauche net, bord droit assez nébuleux. Le sommet se trouve entre $\lambda = 546?$ et 530?, pour une concentration de 21 mgr. % d'alcool; solution rouge, additionnée d'1 cm^3 d'acide chlorhydrique pour 80 cm^3 d'alcool à 95°. Observation sous une épaisseur de 5 mm.

Dans l'ultra-violet la pyocyanine et son chlorhydrate fournissent de magnifiques bandes d'absorption. Pour la pyocyanine base, en solution aqueuse faiblement alcaline, de concentration N/10.000 en fonction de la formule de Ledderhose, nous avons les deux bandes suivantes:

1re Bande $\lambda = 376$
2e Bande $\lambda = 311$

Le chlorhydrate de pyocyanine, pour la même concentration, mais en solution aqueuse légèrement acide, présente les deux mêmes bandes, mais un peu décalées:

1re Bande $\lambda = 390$
2e Bande $\lambda = 281$

La première bande correspond à celle de Cluzet, Rochaix, Kofmann (1921). Ces auteurs n'ayant pas fait varier l'épaisseur de la couche absorbante, ni la concentration de la solution, n'avaient pas aperçu la deuxième bande. Plus récemment, Vellinger (1933) a repris l'étude spectrale de la pyocyanine. A l'aide du spectrophotomètre de Koenig-Martens, il a déterminé le spectre du pigment pour toute l'étendue de l'échelle des pH. Pour le calcul des constantes, il a utilisé le poids moléculaire de 120 déterminé par Wrede et Strack. La forme bleue de la pyocyanine n'aurait pas de bande caractéristique dans le spectre visible. La forme rouge obtenue par lavage de la solution chloroformique avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique présente une forte bande d'absorption dont le sommet est situé à $\lambda = 523$ environ.

La constitution de la pyocyanine établie par Wrede et Strack, telle que nous l'avons exposée plus haut, ne serait pas toujours, d'après Vellinger, en harmonie avec les propriétés de dissociation du pigment. D'après la courbe de dissociation à pH = 6, au moins 20% du pigment se trouve sous la forme rouge, d'où on est en droit de se demander si la forme rouge de la pyocyanine ne jouerait pas un rôle dans la caractérisation de la variété érythrogène de Gessard.

C) BACILLUS CHLORORAPHIS G. et S.

Espèce rencontrée par Guignard et Sauvageau sur des cadavres de vers blancs et par Macé dans des eaux de rivières souillées. Elle se distingue surtout par la formation dans des conditions déterminées, de cristaux verts, réunis en amas visibles à l'œil nu. Lasseur en a fait une étude détaillée et bien documentée.

Caractères morphologiques.

C'est un bacille court: 1μ5 à 2μ5 sur 0,8μ. Extrémités arrondies, parfois renflées. On peut trouver des éléments presque arrondis ou ovoïdes, isolés ou 2 par 2, ou bien des formes allongées de 3μ à 7μ, même 15μ avec addition d'NH^3.

Mobiles avec 1 à 6 cils uni- ou bipolaires. Guignard et Sauvageau ont décrit des spores, de même Jirou. Lasseur n'en a jamais vues. On peut admettre qu'il n'en existe pas.

Le bacille se colore par les colorants ordinaires. Il est Gram négatif.

Propriétés culturales.

Il est aérobie. L'optimum cultural est + 27° C. On obtient une bonne sécrétion de cristaux sur Lasseur synthétique I. Sur Gélatine en plaques, liquéfaction au troisième jour, formation d'une cupule qui s'élargit où apparaissent après 10 à 12 jours des sphéro-cristaux verts. Sur gélatine en piqûre, liquéfaction rapide. De même sur sérum coagulé.

Sur pomme de terre, glaçure jaunâtre, puis points verts. Le bouillon se trouble vite et devient fluorescent. Cristaux au côté opposé à la lumière.

Sur lait: coagulum redissous. Lactose non attaqué. Dégagement d'une odeur de coumarine.

Propriétés biologiques et biochimiques.

Le bacille est tué par un séjour de dix minutes à + 63° C.

Il ne produit pas d'indol. C'est un germe dénitrifiant comme le Bacille pyocyanique. Il n'entraîne aucune fermentation des sucres.

Il secrète une présure, une caséase et un ferment tryptique.

Pouvoir pathogène.

Ce germe s'est montré pathogène pour la souris, la grenouille et divers poissons.

Etude du pigment.

En 1931, Lasseur (32) dont les excellents travaux avaient fait connaître Bacillus Chlororaphis, résumait de la façon suivante l'historique des travaux sur la chlororaphine: «Il m'est difficile d'écrire quelques lignes sur la chlororaphine sans remercier tout d'abord M. le Professeur Kögl et ses collaborateurs, de l'énorme diffusion qu'ils ont donnée aux recherches que j'ai poursuivies sur les pigments bactériens de 1911 à 1926. C'est incontestablement grâce aux publications des Ecoles allemandes et hollandaises que la chlororaphine jouit d'une telle actualité; mais il ne faut pas oublier que Dhéré et Eléma, par leurs études de la fluorescence et du potentiel d'oxydo-réduction, ont fait connaître la chlororaphine sous des jours nouveaux et bien captivants aussi.»

Extraction.

En 1911, Lasseur indiquait le schéma suivant pour montrer les relations entre les divers corps colorés, produits par Bac. Chlororaphis:

XANTHO-RAPHINE	*réduct.*	CHLORO-RAPHINE	*oydat.*	OXYCHLORO-RAPHINE
subs. jaune cryst. soluble eau		subs. verte cryst. insol. eau		subs. jaune cristalline très peu sol. eau

La chlororaphine est peu stable; elle dérive par réduction de la xanthoraphine, et par oxydation se transforme en oxychlororaphine. La chlororaphine apparaît donc, comme une espèce chimique, qui ne pouvait être confondue avec la xanthoraphine ou l'oxychlororaphine.

Les recherches ultérieures de Kögl, Tönnis et Grœnewegen, Kögl et Postowsky (33) en 1930—1932, Eléma (1933), Dhéré (1934) ont démontré que cette manière de voir était exacte. Cependant Kögl identifie la xanthoraphine à l'oxychlororaphine.

L'extraction de la xanthoraphine par le tanin et l'oxyde de plomb, telle que l'indiquait Lasseur, est longue et pénible; c'est pourquoi ce même auteur décrit un nouveau procédé en 1914. Des cultures, riches en xanthoraphine, sont saturées de sulfate d'ammonium à + 40° C. La solution saturée est traitée par l'acétone. On décante, filtre et évapore dans le vide à + 40° C. Lorsque toute l'acétone est évaporée, on élève la température à + 50° C. et on continue la distillation de façon à réduire l'eau, entraînée par l'acétone, à quelques centimètres cubes. On laisse refroidir. On observe alors la formation de longues aiguilles jaunes, groupées en faisceaux, rarement en rosaces: c'est la xanthoraphine impure. Après filtration, les cristaux sont traités par l'alcool à 95°. On obtient une solution louche, qui laisse déposer des cristaux minéraux. On filtre à nouveau, et la solution alcoolique, abandonnée au repos, forme par évaporation de belles aiguilles de xanthoraphine, plus stables que celles extraites par le premier procédé.

Spectre d'absorption.

A l'aide de ces cristaux, Lasseur prépare l'oxychlororaphine et l'oxychlororaphine réduite, dont il examine les spectres.

Dans le visible, en ce qui concerne l'oxychlororaphine réduite, la réduction par HCl et Zn ne doit pas être poussée plus loin que la teinte vert-foncé à vert-noir. L'examen spectroscopique doit se faire peu de temps après la réduction. En opérant avec une solution acétonique, renfermant 34,5 mgr. %, additionnée de 8 cm³ d'HCl % d'acétone, on observe quatre bandes d'absorption, correspondant aux maxima de Formaneck-Grandmougin suivants:

1re Bande $\lambda = 704{,}8$
2e Bande $\lambda = 637{,}6$
3e Bande $\lambda = 587$
4e Bande $\lambda = 537{,}1$

L'oxychlororaphine, observée dans les mêmes conditions, mais avec une concentration de 115 mgr. % d'acétone, ne présente aucune bande d'absorption, mais seulement une absorption continue de l'extrémité du spectre.

Dans l'ultra-violet, les choses sont toutes différentes. C'est maintenant l'oxychlororaphine réduite qui ne donne que deux bandes floues, en solution acétique, contenant 25 mgr. ‰. Les maxima de Formaneck-Grandmougin seraient approximativement:

1re Bande $\lambda = 467$?
2e Bande $\lambda = 368$?

car la nature des bandes ne permet pas une détermination exacte. L'oxychlororaphine, au contraire, donne une large bande d'absorption dans l'ultra-violet, pour une concentration de 25 mgr. ‰ en solution acétique. Le maximum de Formaneck-Grandmougin est:

$$\lambda = 366.$$

(arc du fer: 220 volts, 5 ampères, fente de 0,015 mm.).

M. le Prof. Bauderet observe une solution moins concentrée, soit 20 mgr. ‰. Avec l'arc du fer, 220 volts, 6 ampères et une fente spectroscopique de 0,01 mm. Il obtient des clichés présentant une forte absorption, dont on peut aisément déterminer le maximum d'absorption correspondant à: $\lambda = 366$.

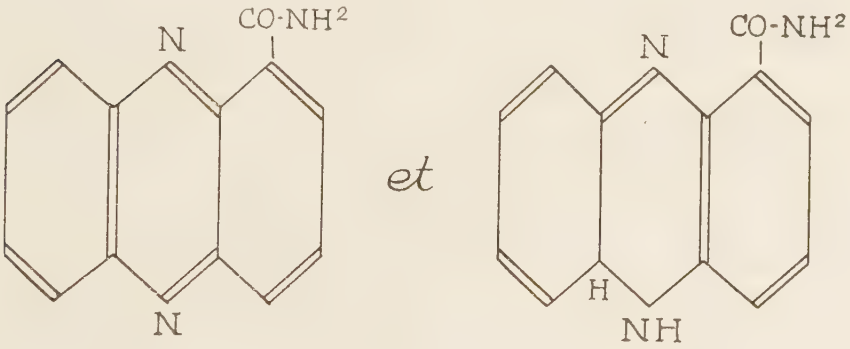
Constitution chimique.

En 1929, à la demande de M. le Prof. Rippel de Göttingen Lasseur, dans un geste désintéressé, consentait à adresser son unique échantillon d'oxychlororaphine à Kögl. Ce dernier et ses collaborateurs devaient établir définitivement la constitution chimique de la chlororaphine.

L'oxychlororaphine, traitée par la potasse, donne une molécule d'ammoniaque et par acidification il se précipite des aiguilles jaunâtres de formule:

$$C^{13}H^8O^2N^2.$$

Par décarboxylation, l'acide donne une substance jaune, cristalline de formule: $C^{12}H^8N^2$, c'est la phénazine. Nous avons relaté plus haut les travaux de Wrede et Strack (1928) montrant l'importance de l'α-oxyphénazine dans la constitution de la pyocyanine. Dès lors Kögl et Postowsky (1930) pensèrent, que l'oxychlororaphine devait être un dérivé α-substitué de la phénazine. Ils ont ainsi été conduits à faire la synthèse de la phénazine α-carbonamide. Ce corps possède les mêmes propriétés physiques et chimiques que l'oxychlororaphine. Par réduction en solution acétique ils préparent un dérivé vert. Ils estiment donc: «qu'il n'y a aucune raison de douter de l'identité du produit vert synthétique avec la chlororaphine». Pour ces savants la chlororaphine est un composé dimoléculaire de phénazine α-carbonamide et de son dérivé dihydro:



Chlororaphine

Le dérivé dihydro, n'est autre chose que la xanthoraphine.

Kögl, Postowsky et J. Rocha ont déterminé le poids moléculaire à l'aide de solutions de concentrations croissantes en chlororaphine. Il passe de 219 à 372 et se rapproche du poids moléculaire théorique du composé dimoléculaire. Mais malgré cette association la coloration ne tend pas au vert. Cette coloration cependant apparaît par cristallisation. Kögl et Tönnis estiment que le «chinhydron-effekt» n'est pas déterminé par l'association des molécules en solution, mais par un: «arrangement plus étroit dans le réseau cristallin et aussi par formation d'un ion, ayant la nature d'un radical organique».

Potentiel oxydo-réducteur.

Eléma étudia le potentiel d'oxydo-réduction de la chlororaphine sur un échantillon, que Kögl lui envoya en 1933. Il fit varier le pH de 1,01 à 0,01. A ces pH la solution de phénazine α-carbonamide est légèrement jaune. En réduisant par le palladium et l'hydrogène, la coloration passe au jaune-verdâtre, puis au vert émeraude; enfin la coloration devient verte et jaune-orangée (dihydro-phénazine α-carbonamide). L'oxydation du dérivé dihydro donne tout d'abord la coloration verte (chlororaphine) et dans une deuxième phase, la chlororaphine donne la phénazine α-carbonamide. Par réduction des solutions aqueuses d'oxychlororaphine, entre pH = 0 et pH = 3, Eléma met en évidence l'existence d'une semi-quinone verte. Cette réduction et la réduction en forme dihydro sont réversibles. Avec la chlororaphine, l'auteur retrouve un exemple des faits observés par Michaélis et Hill (1933) à savoir que la semi-quinone d'un dérivé de phénazine est verte.

Etude fluoroscopique

Ch. Dhéré entreprend en 1934, une étude fluoroscopique de la chlororaphine et de ses dérivés. L'oxychlororaphine, à l'état sec ou en suspension dans l'eau ne montre qu'une très légère fluorescence verte. Il en est de même des solutions dans l'alcool méthylique et l'acétone additionnée d'eau.

Par réduction jusqu'au dérivé dihydro, on obtient des solutions, dont la fluorescence «relativement bien intense est orangée ou rouge-orangée». Mais le fait remarquable est: «la très forte fluorescence des cristaux de dihydro-phénazine α-carbonamide, tandis que la chlororaphine est pratiquement dépourvue de fluorescence à l'état cristallisé».

Synthèse biologique.

En 1932, Kögl, Tönnis et Grgenewegen ont cherché à réaliser la synthèse biologique de la phénazine α-carbonamide. A cet effet, ces savants ont additionné les milieux de culture de Bac. Chlororaphis, de 30 mgr. d'acide phénazine α-carbonique. Après 4 jours, les cultures renferment 11,9 fois plus de phénazine α-carbonamide que les témoins, non additionnés d'acide phénazine α-carbonique. La production n'est pas dûe à un changement du pH, et les savants considèrent que l'amidation de cet acide constitue une étape de la synthèse biologique de l'oxychlororaphine.

Chapitre II.

Les différentes bactéries violettes.

La production d'un pigment violet a été signalée chez de nombreuses bactéries. Nous citerons:

Bacillus Violaceus Zimmermann.
— Violaceus (Zopf) Adametz.
— Violaceus Macé.
— Violaceus Eisenberg.
— Violaceus Frænkel.
— Violaceus Nieman.
Bacterium Janthinum Zopf.
Bacillus Janthinus Zimmermann.
— Janthinus L. et N.
— Membranaceus amethystinus Eisenberg.
— Membranaceus amethystinus mobilis Germano.
— Violaceus Lawrentius.
— Berolinensis Indicus. Clæssen.
— Viscofucatus Harrisson & Barlow.
Chromobacterium Violaceum Bergonzoni.
Bacillus Lilantinus Macé.
— Violaceus Laurentius Jordan.
— Violarius acetonicus Bréaudat.
— Cristallino violaceum n. sp. Cholkévitch.
— lividus Plagge & Proskauer.
— violet pathogène Gauducheau... etc..

Nous nous proposons de résumer dans ce chapitre les principaux caractères bactériologiques des espèces suffisamment décrites, en insistant surtout sur B. Violaceus Macé, qui se rapproche le plus du germe que nous avons étudié.

Dans un ouvrage paru en 1934, P. Godfrin a déjà essayé d'établir une classification de ces différentes Bactéries. En 1926, Lasseur proposait de grouper les bactéries énumérées en germes mobiles et en germes immobiles. Mais malheureusement quelques savants seulement ont décrit avec suffisamment de détails les organismes qu'ils avaient isolés, si bien qu'une classification, à l'heure actuelle est très difficile et reste très aléatoire.

BACILLUS VIOLACEUS MACE 1888.

B. violaceus Macé (34) a encore été appelé Bactéridium Violaceum Schrötter (35), B. Violaceus G. & P. Frankland 1894 (36), Pseudomonas Violacea (Schrötter) Migula 1900 (37), Pseudomonas pseudianthina Migula 1900.

Origine.

On la rencontre fréquemment dans l'eau. Macé la mentionne en 1888 comme existant dans les eaux de puits, de citerne et de rivière; Artault en 1893 (38) l'a signalée dans des œufs.

Rencontrée souvent aussi dans des liquides en putréfaction, sa présence coïnciderait d'après Macé, Bréville (39), Imbeaux (40) avec celle d'une forte proportion de matières organiques. D'après Macé, son germe correspondrait à celui provenant de l'air, décrit par Schrötter en 1880 sous le nom de Micrococcus Violaceus. Bujwid en 1887 (41) l'aurait caractérisé de même dans de l'eau de fusion de grêlons. Jordan (42) et Marschall Ward (43) ont décrit des germes identiques. Macé l'a souvent aussi isolée d'échantillons de terre et de liquides de l'organisme en décomposition.

Morphologie.

Ce sont des bâtonnets à extrémités arrondies, de 2μ à 3μ de long sur 0μ4 à 0μ5 de large. Le germe, isolé par G. & P. Frankland en 1889, d'une eau de rivière, était un bâtonnet court de 1μ7 sur 0μ8

Motilité.

Il serait lentement mobile d'après Macé 1888 et ne présenterait pas de fouets à la température ordinaire. Mais le

même auteur en 1913, écrit que le germe est immobile. Cependant Migula a caractérisé un fouet polaire chez Ps. Violacea Migula et B. Violaceus G. & P. Frankland.

Sporulation.

Dans les vieilles cultures, il y aurait formation de spores arrondies. La gélose surtout est favorable et les spores, peu nombreuses d'ailleurs, apparaissent au milieu de la plastide qui se gonfle.

Colorabilité.

Ne prend pas le Gram.

Facilement coloré par le Bleu de méthylène ou de toluidine. Il n'est pas acido ni alcoolo résistant.

Température.

Se cultive à la température du laboratoire. Il serait assez sensible à la chaleur, car un séjour d'une minute à 55° détruirait 80% des germes.

Aérobiose.

C'est selon Macé *un germe aérobie.*

CARACTERES DE CULTURE.

Milieux solides.

Gélatine: 1° Sur plaques, on obtient rapidement des colonies à bords sinueux, présentant une surface ondulée. La partie centrale s'enfonce assez rapidement et la liquéfaction est brusque. La colonie surnage et se colore lentement en violet. Cette coloration se fait tantôt sur toute la surface, tantôt sur une partie en procédant par zônes concentriques.

2° En piqûre, on observe peu de temps après l'ensemencement une liquéfaction. Une pellicule adhérente aux parois se forme en surface et présente parfois un mince liséré violet. Au fond, se forme un dépôt blanc-violacé.

Gélose. On obtient en deux à trois jours une culture épaisse et plissée, se colorant rapidement en violet-noir.

Pomme de terre. Produit un enduit visqueux d'un beau violet-noir.

Milieux liquides.

Bouillon. Même développement que sur gélatine liquéfiée; c'est-à-dire formation d'un liquide trouble, surmonté d'une pellicule blanche adhérente aux parois.

Milieux synthétiques.

W.-J. Hartley en 1913, a cultivé sur milieux synthétiques un Bacille identique à B. violaceus Macé. Les milieux favorables contenaient soit lactose, soit amidon.

PROPRIETES BIOCHIMIQUES.

Indol. Il ne produit pas d'Indol.

Nitrates. Il ne réduit pas les nitrates.

Variabilité du pouvoir chromogène. Bac. Violaceus secrète un pigment violet et caractéristique de l'espèce. D'après certains savants (Macé) il ne semblerait pas imprégner les cellules, mais la matière gélatineuse qui réunit les bacilles en zooglées. Maximum à un certain moment, il arrive après plusieurs passages sur les milieux de cultures, à disparaître complètement. Les cultures deviennent moins abondantes et seulement colorées par endroits. Par des passages sur pomme de terre, on arrive à faire récupérer à ces germes, en partie du moins, leur pouvoir chromogène.

Odeur. Les cultures sur gélatine surtout dégagent fréquemment une forte odeur d'acide butyrique.

Pouvoir pathogène. Woolley (44) a décrit sous le nom de Bacillus violaceus Manillae, un microbe très pathogène pour le cobaye et le lapin, ressemblant beaucoup par sa morphologie à Bac. Violaceus Macé. Il l'a isolé des ganglions lymphatiques de trois buffles ayant succombé rapidement.

Nous décrirons encore plus loin un second bacille violet pathogène isolé d'une eau de puits en 1907 par Gauducheau.

CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM BERGONZONI.

Comittee S. A. B. 1920.

On peut, d'après Bergey, rencontrer encore ce germe sous le nom de Bacillus Violaceus, sociéta d. Naturalisti, Ser. 2, 14, 1881, 149.

Origine. Eaux.

CARACTERES MORPHOLOGIQUES.

Forme. Bâtonnets grêles de 0 μ 8 à 1 μ sur 2 μ à 5 μ, isolés ou en chaînettes.

Motilité. Mobile.

Fouets. Péritriches.

Colorabilité. Ne prend pas le Gram.

CARACTERES DE CULTURE.

Température. Optimum: 25°—30° C.

Aérobiose. Aérobie.

CARACTERES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU.

Milieux solides.

Gélatine. Colonies rondes, grises, coloration violette dans la région centrale, liquéfaction en entonnoir.

Gélose. Colonies blanchâtres devenant violettes.

Pomme de terre. Culture violet-foncé.

Milieux liquides.

Bouillon. Trouble avec formation d'un anneau violet.

Lait tournesolé. Pellicule violette, peptonisation, alcalinisation.

PIGMENT.

Violet.

BACILLUS LAURENTIUS JORDAN 1890.

B. Violaceus Laurentius, encore appelé Pseudomonas Laurentia (Jordan) Migula 1900, a été trouvé dans les eaux du bassin de filtration de la Laurence. Il a été décrit par Lustig (45) et par Vogès (46) en 1893.

Origine. Eaux.

CARACTERES MORPHOLOGIQUES.

Forme. Bâtonnets groupés par 2, par 4 ou 5. Extrémités arrondies. Dimensions: 3 μ à 3 μ 6 sur 0 μ 6.

Motilité. Très mobile.

Spores. Pas de spores.

Colorabilité. Ne prend pas le Gram.

CARACTERES DE CULTURE.

Milieux solides.

Gélatine. Colonies superficielles, croûteuses, violettes; colonies profondes granuleuses.

Milieux liquides.

Bouillon. Développement faible.

Bouillon nitrate de potasse. Développement plus riche, coloration violette.

Lait. Coagulation, coloration violette.

PIGMENT.

Violet.

BACILLUS VIOLARIUS ACETONICUS BRÉAUDAT 1906.

B. Violarius Bréaudat fut étudié en 1906 (47).

Origine. Eaux.

CARACTERES MORPHOLOGIQUES.

Forme. Bacille court, épais 3 μ sur 1 μ.

Motilité. Mouvement d'oscillation rapide.

Fouets. Pas mis en évidence.

Spores. Apparaissent vers le 6^{e} jour de culture.

Colorabilité. Ne prend pas le Gram.

CARACTERES DE CULTURE.

Température. Se développe de 30° à 37° C.

Aérobiose. Aérobie facultatif.

Action sur les nitrates. Réduit les nitrates en nitrites.

Acétone. Production d'acétone, empêchée par l'ammoniaque.

CARACTERES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU.

Gélose. Se développe bien.

Lait. Coagulation puis peptonisation.

PIGMENT.

Violet intense.

BACTERIUM CRISTALLINO VIOLACEUM.

Sp. Nov. Cholkevitch.

Cette espèce a été décrite il y a peu de temps par Cholkevitch en 1922 (48).

Origine. Isolé d'un morceau de tourbe.

CARACTERES MORPHOLOGIQUES.

Forme. Germe à extrémités arrondies; dimensions variables suivant le milieu: 3 μ 25 à 2 μ 25 de longueur sur milieu liquide; 1 μ 5 sur 0 μ 75 à 0 μ 37 sur milieu solide.

Motilité. Mobile dans les cultures jeunes.

Spores. Pas de spores.

Capsule. Grosse capsule visible sans coloration.

Colorabilité. Ne prend pas le Gram.

CARACTERES DE CULTURE.

L'auteur ne donne aucun caractère de culture.

PIGMENT.

Violet.

BACILLUS JANTHINUS (ZOPF) FLÜGGE 1886.

B. Janthinus Zopf (49) a encore été appelé Bacterium janthinum Zopf 1885, Bacillus Janthinus (Zopf) Migula 1900, Bacillus Janthinus Zimmermann 1890 (50) ; Chromobacterium Janthinum Bergey 1923. Il a été décrit par Flügge en 1886 (51), par Bujwid en 1888 (52) et par Lustig en 1893. De nombreux auteurs tels que Hueppe (53) et Zimmermann l'ont trouvé de même dans l'eau.

Origine. Eaux.

CARACTERES MORPHOLOGIQUES.

Forme. Bâtonnets de 1 μ 5 à 3 μ 5 sur 0 μ 6, extrémités arrondies.

Motilité. Mouvement de rotation sur lui-même.

Fouets. Pas de fouets.

Spores. Absence de spores.

Colorabilité. Ne prend pas le Gram.

CARACTERES DE CULTURE.

Milieux solides.

Gélatine. Liquéfaction lente, seulement par les colonies de surface.

Pomme de terre. Bon développement.

PIGMENT.

Violet foncé.

BACILLUS LILACINUS MACE.

Cette espèce a été décrite par Macé en même temps que le Bacillus Violaceus Macé et il la distingue nettement des espèces précédentes.

Origine. Eaux.

CARACTERES MORPHOLOGIQUES.

Forme. «Fins bâtonnets».

Motilité. Immobiles.

CARACTERES DE CULTURE SELON LES MILIEUX.

Gélatine. 1° En plaque: colonies d'abord blanches; puis une pellicule s'enfonce dans la gélatine liquéfiée en formant une cupule. Coloration violet-lilas clair.

2° En piqûre: petit disque mauve qui s'enfonce peu à peu pour former un entonnoir, tapissé d'une pellicule très adhérente de couleur mauve.

Gélose. Culture mauve-rosée.

Pomme de terre. Pas de développement abondant. Coloration amarante.

Sérum coagulé. Culture muqueuse rose-clair.

Liquéfaction lente.

PIGMENT.

Violet-mauve clair.

BACILLUS LIVIDUS PLAGGE ET PROSKAUER 1887.

Ce germe est encore appelé Bacterium Lividum (Plagge et Proskauer) Migula 1900; Chromobacterium lividum (Flugge) Bergey 1923, et a été décrit en 1887 par Plagge et Proskauer, (54) qui l'avaient isolé d'une eau de conduite de Berlin.

Origine. Eaux.

CARACTERES MORPHOLOGIQUES.

Forme. Bâtonnets de 1 μ 5 à 4 μ 7, bouts arrondis.

Motilité. Peu mobiles.

Fouets. Pas de fouets.

Spores. Pas de spores.

Colorabilité. Ne prend pas le Gram.

CARACTERES DE CULTURE.

Température. Température ordinaire.

Aérobiose. Aérobie facultatif.

CARACTERES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU.

Milieux solides.

Gélatine. Liquéfaction faible.

Gélose. Croissance.

Pomme de terre. Culture luisante visqueuse.

PIGMENT.

Bleu-violet.

BACILLUS MEMBRANACEUS AMETHYSTINUS EISENBERG 1891.

Encore connu sous le nom de Bacterium Amethystinum (Eisenberg) Migula 1900, et de Chromobacterium membranaceum Bergey 1923. Il fut découvert en 1891 dans l'eau d'un puits de Spolato et décrit par Eisenberg (55). Une variété «mobilis» a été décrite en 1892 par Germano (56).

Origine. Eau de puits.

CARACTERES MORPHOLOGIQUES.

Forme. Bâtonnets courts à bouts arrondis, de 1 μ à 1 μ 4 sur 0 μ 5 à 0 μ 8.

Motilité. Immobile.

Spores. Absence de spores. (Pas prouvé selon Eisenberg.)

Colorabilité. Ne prend pas le Gram.

CARACTERES DE CULTURE.

Température. Se développe vers 15°—20° C., pas à 37° C.

Aérobiose. Anaérobie facultatif.

CARACTERES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU.

Milieux solides.

Gélatine. Liquéfaction.

Gélose. Colonies blanches devenant violettes dès le 8e jour. Eclat métallique au bout d'un mois.

Pomme de terre. Culture lente.

PIGMENT.

Bleu-violet.

POUVOIR PATHOGENE.

Hypothermisant.

BACILLUS MEMBRANACEUS AMETHYSTINUS I 1913. BACILLUS MEMBRANACEUS AMETHYSTINUS II BAMPTON 1913.

Après B. Membranaceus Amethystinus Eisenberg, il est absolument nécessaire de signaler deux espèces mobiles connues sous le nom de B. Membranaceus Amethystinus I et B. Membranaceus Amethystinus II qui ont été décrites en 1913 par Bampton et reprises par Bergey en 1923. Ces germes sont encore connus respectivement sous le nom de Chromobacterium Membranaceum (Bampton) Bergey 1923 et de Chromobacterium Bamptonii Comb. nov. Bergey.

CARACTERES MORPHOLOGIQUES.

Forme. Bacille 1 μ 4 à 3 μ 5, isolé ou courtes chaînettes.	Bacille 1 μ 4 à 3 μ 5, extrém. arrondies.
Motilité. Mobile.	Mobile.
Fouets. Fouets péritriches.	Fouets péritriches.
Colorabilité. Ne prend pas le Gram.	Ne prend pas le Gram.

CARACTERES DE CULTURE.

Température. Optimum: 37°5.	Optimum: 30° C.
Aérobiose. Aérobie.	Aérobie.
Indol. Ne produit pas d'indol.	Ne produit pas d'indol.
Action sur les nitrates. Ne réduit pas les nitrates.	Ne réduit pas les nitrates.
Dextrose et maltose. Sont attaqués.	Sont attaqués.

CARACTERES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU.

Gélatine. Colonies blanc-bleuâtre, liquéfaction lente.	Colonies pâles bleuâtres, violettes en profondeur.

Gélose. Colonies blanc-jaunâtre, violet pâle.	Colonies violet-pâle.
Pomme de terre. Trouble, pellicule bleu pâle.	Masse brun jaunâtre.
Lait tournesolé. Alcalinisation puis peptonisation.	Alcalinisation puis peptonisation.
Bouillon. Culture brune à violette.	Trouble, pellicule violette.
PIGMENT.	
Violet.	Violet.

BACILLE VIOLET PATHOGENE DE GAUDUCHEAU 1907.

Ce germe a été isolé d'un puits à Hanoï et étudié en 1907 par Gaducheau. Il se rapprocherait, d'après l'auteur de B. Janthinus et de B. Violaceus Laurentius.

Origine. Eau de puits.

CARACTERES MORPHOLOGIQUES.

Forme. Bacilles de 1 μ à 3 μ, souvent incurvés.

Motilité. Mobile.

Colorabilité. Ne prend pas le Gram.

CARACTERES DE CULTURE.

Température. Se développe bien au-dessus de 20° C. Température mortelle: 15 minutes à 56° C.

Odeur. Rappelant odeur d'amandes amères.

CARACTERES DE CULTURE SUIVANT LE MILIEU.

Milieux solides.

Gélatine. Liquéfaction.

Milieux liquides.

Lait. Coagulation et peptonisation.

PIGMENT.

Violet.

POUVOIR PATHOGENE.

Hypothermisant considérable.

Chapitre III.

Les pigments violets.

Personne ne doute, que les différentes bactéries violettes, que nous venons de décrire brièvement, ne secrètent pas le même pigment. Déjà les colorations variables d'une espèce à l'autre en sont une preuve. Cependant, rarement les auteurs ont décrit le germe, dont ils étudiaient le pigment. Ils l'appellent en général provisoirement «Bacille violet» sans plus de précisions. Nous rassemblerons donc les différents travaux sur les pigments, qui nous ont paru identiques ou du moins semblables, pour les analyser successivement.

Conditions de production des pigments.

Macé, déjà, avait remarqué, que son bacille violet perdait peu à peu son pouvoir chromogène par repiquages successifs. Il indique le passage sur pomme de terre pour faire récupérer, en partie du moins, le pouvoir chromogène à son bacille. Il signale également l'importance du contact de l'air. Hartley (57) qui a également étudié le pigment d'un bacille violet, indique les milieux contenant du lactose ou de l'amidon comme les plus favorables à la chromogénèse. Friedheim signale le milieu au riz de Soyka.

Lasseur, dans ses études sur la violacéine, donne les mêmes conseils que Macé. Il est le premier à signaler l'importance des éléments minéraux sur la production de la violacéine, notamment du fer, du phosphore et du magnésium. Ces éléments, à l'état de traces, sans entrer dans la composition même du pigment, sont indispensables pour provoquer la

chromogénèse. Le même auteur note également la relation, qui doit exister selon lui, entre la surface et la profondeur du milieu, car les cultures en tubes et celles en ballon ne donnent pas toujours les mêmes résultats.

Gauducheau, en étudiant son bacille violet pathogène remarque de même la variabilité du pouvoir chromogène; c'est donc une propriété commune à tous les bacilles violets.

Méthode d'extraction des pigments.

Macé ne donne aucune méthode d'extraction du pigment; il signale simplement sa solubilité dans l'alcool fort.

Lasseur et Girardet donnent le procédé suivant pour des cultures sur milieu liquide: les voiles sont lavés soigneusement à l'eau distillée puis desséchés dans le vide sur l'acide sulfurique, après avoir été exprimés légèrement entre des feuilles de papier filtre. Le produit fut pulvérisé et le traitement par l'alcool fort de cette poudre donnait un liquide que l'on additionnait d'un peu d'eau et l'on évaporait ensuite dans le vide à 40°— 50° C. pour réduire le volume à quelques centimètres cubes. Il précipitait des flocons violets, que l'on dissolvait sur filtre avec de l'alcool faible. L'évaporation dans le vide précipitait une matière colorante, qui était soumise à une série de purifications par solubilisations dans l'éther et l'alcool. Ils obtenaient, à la fin des ces opérations fort longues, une poudre amorphe, mate, sèche, qu'ils purifiaient par la méthode capillaire de Goppelsrœder (59).

Hartley, en 1913, étudiant également une violacéine, préconise le mode d'extraction suivant: il utilise des cultures sur pomme de terre. Les corps microbiens sont épuisés par l'alcool absolu au Soxhlet. Le liquide ainsi obtenu est mis à décanter huit jours durant. On obtient finalement une liqueur violette ne contenant plus d'amidon, provenant de la pomme de terre. La solution évaporée dans le vide, laisse déposer une masse amorphe violette, presque noire, donnant en solution alcoolique une teinte violette.

Friedheim (60) décrit une autre méthode. Il extrait le pigment par l'acétone. La solution évaporée laisse un résidu violet, qui séché, lavé à l'eau, est repris par l'éther éthylique sec. Il obtient par un courant de gaz chlorhydrique sec, le chlorhydrate de violacéine, qui précipite. Il se dissocie par simple action de l'eau et le pigment pur, mais non cristallisé, précipite.

Solubilité.

Tous les auteurs sont d'accord pour l'insolubilité dans l'eau. La plupart le décrit comme soluble en bleu dans l'alcool et violet-rouge dans l'acétone. Il règne une confusion, au sujet de l'éther sulfurique; les uns disant qu'il y est soluble les autres non. Insoluble dans l'éther de pétrole et le chloroforme pour celui de Lasseur, tandis que Hartley décrit un pigment violet soluble dans le chloroforme.

Il est également soluble dans l'alcool amylique et la pyridine, et insoluble dans les carbures aromatiques et le sulfure de carbone.

Propriétés chimiques.

Macé signale le premier l'action des bases et des acides: le pigment passe au vert par addition de NaOH ou de KOH, puis la coloration verte disparaît et la liqueur devient brun-jaune. L'ammoniaque diluée est sans action; concentrée, le pigment passe au bleu puis au vert. Au contact prolongé la solution se décolore. L'addition d'acides fait passer les solutions au bleu intense puis au vert; la neutralisation régénère la coloration primitive. L'acide sulfurique seul dissout le pigment en jaune-orange. De cette solution le pigment précipite par dilution, en flocons verts, qui jetés sur un filtre passent au violet par lavages à l'eau.

Lasseur décrit une teinte rose puis bleue par addition d'alcool dans la solution sulfurique du pigment.

Les oxydants, tels que perborates et perhydrol ont peu d'action sur le pigment à la température ordinaire, mais à +50° C. ces mêmes oxydants décolorent rapidement les solutions. L'exposition à l'air décolore lentement les solutions alcooliques. Le zinc et l'acide chlorhydrique, l'hydrosulfite décolorent rapidement et à froid les solutions, sans que l'on puisse régénérer la coloration primitive par addition d'un oxydant.

Hartley donne les mêmes propriétés chimiques pour le pigment qu'il décrit en 1913. Friedheim obtient un chlorhydrate amorphe par le procédé que nous indiquons plus haut.

Spectre d'absorption.

Pour caractériser les violacéines les propriétés chimiques ne suffisent pas. Il est nécessaire d'avoir recours à l'étude

des spectres d'absorption. Ceux-ci ont été étudiés par de nombreux auteurs. Lecoq de Boisbaudran (61) a caractérisé en 1882, une bande d'absorption dont le milieu apparent était situé vers λ=581, pour un pigment violet d'origine bactérienne se produisant dans certaines colles de farine.

J. Hartley en 1913, a étudié à l'aide de la méthode imaginée par son père, le pigment secrété par un bacille violet de l'eau; la solution alcoolique du pigment ne fournissant pas d'absorption sélective dans l'ultra-violet, offre une seule bande d'absorption s'étendant de λ=640 à λ=490 environ, dans le spectre visible; la solution examinée renfermait 22 mgr. pour dix centimètres cubes d'alcool et l'examen portait sur une épaisseur de 5 mm. Lorsque la solution alcoolique renferme 22 mgr. pour 80 centimètres cubes, sous une épaisseur de 5 mm. la bande d'absorption s'étend de λ=640 à λ=590. L'étude a été faite à l'aide du spectroscope de Zeiss. Sous une épaisseur de 10 mm. il y avait absorption totale des rayons rouges pour une concentration de 0,22 gr. % en solution alcoolique. Le bleu et l'indigo étaient seuls transmis. Sous une épaisseur de 5 mm. on note une transmission de rayons rouges de λ=670 à λ=640. Sous une épaisseur de 25 mm. l'absorption était totale.

Ces études spectroscopiques sur la violacéine furent reprises par Lasseur et Girardet en 1926.

Dans la partie visible du spectre, les solutions alcooliques renfermant 5,3 mgr. de pigment pour cent cm^3 de solvant, présentent une large bande d'absorption asymétrique. On observe en outre une absorption continue du violet. Par dilution de la solution alcoolique la bande d'absorption décrite précédemment se dédouble en deux bandes, correspondant aux maxima de Formaneck-Grandmougin suivants:

1re Bande: λ=629.6

2e Bande: λ=581.5

La bande I est très floue et nébuleuse. Elle est très facilement perceptible lorsqu'on opère sur des solutions très diluées dont on fait varier l'épaisseur. Pour certaines épaisseurs on est contraint d'utiliser un verre absorbant.

Les solutions alcooliques additionnées d'acide sulfurique virent au bleu. Les bandes d'absorption se déplacent et l'on note l'apparition d'une troisième bande. Cette dernière, très

faible, persiste cependant fort longtemps. Le tableau suivant reproduit les maxima de Formaneck-Grandmougin, pour des solutions alcooliques (concentration: 26 mgr. de substance colorante pour cent cm^3 de solvant) additionnées de deux cm^3 d'acide sulfurique pur du commerce pour cent cm^3 de solution.

1re Bande: λ=704,8 bande forte

2e Bande: λ=637,5 bande nébuleuse

3e Bande: λ=586,8 bande très faible.

Dans l'ultra-violet, le spectre d'absorption selon Lasseur et Girardet, n'est pas caractéristique. On note deux bandes d'absorption déjà décrites par les mêmes auteurs à propos du pigment jaune de l'Aleurisma flavissima. Ces deux bandes d'absorption s'étendent de:

1re Bande: λ=284 à λ=276

2e Bande: λ=271 à λ=261

ceci pour une solution alcoolique renfermant 0,04 gr. ‰ de substance colorante, examinée sous une épaisseur de 35 mm. L'addition d'acide sulfurique ne modifie pas sensiblement le spectre ultra-violet.

De ces travaux, Lasseur et Girardet tirent les conclusions suivantes: «Hartley n'a décrit qu'une seule bande d'absorption, or cet auteur a fait varier la concentration de ses solutions, par suite il aurait perçu la deuxième bande si elle avait existé dans ses solutions. Le pigment étudié par Hartley semble donc différent de celui que nous examinons aujourd'hui. En ce qui concerne les observations de Lecoq de Boisbaudran, il est plus difficile de se prononcer. L'auteur n'a pas fait varier méthodiquement l'épaisseur de la couche liquide. Néanmoins, il est difficile d'admettre qu'une bande, même nébuleuse ait pu échapper à l'un des maîtres de la spectroscopie. Sous cette réserve nous constatons que le maximum d'absorption: λ=581 trouvé par Lecoq de Boisbaudran, correspond bien au maximum que nous attribuons à la deuxième bande de notre pigment.»

Puis ces auteurs, établissent des comparaisons entre les spectres de la violacéine, prodigiosine et oxychlororaphine, que nous avons déjà relatées plus haut.

Nature chimique.

La composition chimique de la violacéine n'est pas connue. Tout récemment cependant, en 1936, Tobie (86) analyse la matière colorante de Bacillus Violaceus II. Ce pigment est très riche en fer et se range parmi les colorants à noyau pyrrolique. Cette violacéine «Tobie» serait donc voisine de la prodigiosine.

Rôle de la violacéine.

Ernst Friedheim en 1932, examine le rôle du pigment violet. Antérieurement le même auteur avait déjà démontré le rôle respiratoire de la pyocyanine. L'addition de pyocyanine cristallisée à des cultures achromogènes, privées de toute substance nutritive exogène, augmente la respiration jusqu'à 2.400 fois et ramène le coefficient respiratoire de 0,1 à 1. Cette action catalysante ne se manifeste que sur les bacilles privés de toute matière nutritive exogène. Le système respiratoire dans les bacilles non pigmentés, qui par sa sensibilité envers le cyanure de potassium et l'oxyde de carbone, paraît rentrer dans le cadre du ferment respiratoire de Warburg à base de fer, est parfaitement suffisant pour assurer l'oxydation des substances nutritives exogènes, mais insuffisant pour assurer la combustion des substances nutritives propres du corps bacillaire.

Pour voir si ce fait était isolé, Friedheim étudia Bac. Violaceus (Schrötter) L. et N. saprophyte de l'eau, se présentant sous la forme d'un petit bâtonnet mobile, Gram négatif. La souche fut fournie par le Prof. Pribram de Vienne.

L'influence du pigment, isolé selon la méthode décrite précédemment, fut étudiée en mesurant la respiration d'une quantité aliquote de suspension de bacilles non pigmentés, dans une solution tampon de phosphate m/15 et d'un pH=7,2, dépourvue de toute substance nutritive exogène. La consommation d'oxygène fut déterminée à +21° C., selon la technique manométrique de Barkoft-Warburg. Le pigment étant insoluble dans l'eau, on dut avoir recours à sa solution glycérinée pour l'incorporer à la suspension bacillaire. La concentration finale en glycérine fut de 6.6%, en pigment de 1/20.000. Dans ces conditions, le pigment floculе après trente minutes. Les expériences furent donc limitées à ce laps de temps. L'auteur obtint, à l'aide de ces méthodes les résultats suivants: Le bacille non pigmenté en solution

tampon de phosphate et 6,6% de glycérine, présente déjà une respiration appréciable, mais l'addition du pigment provoque une augmentation de la respiration jusqu'à 231%. Des contrôles établirent que la solution de pigment et de glycérine à elle seule ne consomme pas d'oxygène.

Quant au mécanisme de l'accélération de la respiration provoquée par le pigment violet, il faut considérer que le pigment est très facilement réduit en un leuco-dérivé, par des agents tels que l'hydrosulfite de sodium, hydrogène en présence de Pd colloïdal. Par contre la réoxydation à l'air ne s'observe guère, même en faisant agir les oxydants tels que ferricyanure, persulfate et eau oxygénée. On ne peut donc qu'affirmer pour le moment, dit l'auteur, que le pigment accélère la respiration en sa qualité d'accepteur d'hydrogène, mais on ne peut dire qu'il soit un catalyseur parfait, régénéré au cours d'un cycle. La violacéine joue donc un rôle de pigment respiratoire, quand le bacille est obligé de vivre sur ses propres réserves. L'oxydation porterait, selon l'éminent savant, sur les lipides, puisque le pigment insoluble dans l'eau, a une affinité particulière pour ces corps.

Un autre pigment violet, à propriétés nettement différentes, est sécrété par Bacterium Cristallino Violaceum sp. nov. Cholkevitch.

Cultures.

Dans les cultures de 24 heures, l'auteur décrit un processus de destruction des bacilles qui s'agglutinent en une masse informe, où ne dominent bientôt plus que des grains polaires constituant des amas. Cette masse homogène de grains cristallise en aiguilles violettes, plus rarement jaunes ou rouges. Les cristaux, contenant des débris du corps granulé multicolore dont ils proviennent, forment des agrégats en forme d'éventail, de papillon; parfois ils sont isolés ou constituent de longs filaments.

Pigment.

Le pigment serait un produit d'excrétion. Il serait fixé par le corps des bactéries mortes, formant des granulations, analogues aux sphérites décrits par Beijerinck (62) pour Bac. Cyaneo-fuscus.

Les cristaux sont insolubles dans l'eau à froid ou à l'ébullition, dans l'éther sulfurique, le xylol, la benzine, le chloroforme, la glycérine et les alcools. L'auteur n'a pu séparer de leur squelette albuminoïde la matière colorante des cristaux sphériques. Sous l'action de solutions alcalines faibles on obtient un liquide bleuâtre, qui devient violet et le demeure sous l'action de solutions faibles des acides chlorhydrique et azotique.

L'examen spectroscopique de lames enduites de pigment non purifié a donné deux bandes d'absorption, d'après les essais effectués par le Prof. Lubimenko. La première très nette s'étend de: $\lambda = 585$ à $\lambda = 625$. La deuxième, plus faible s'étend de: $\lambda = 510$ à $\lambda = 480$.

DEUXIEME PARTIE.

Origine, étude morphologique et biologique de

Bacillus violaceus N. Sp. Sartoryi

Ses caractères culturaux et biochimiques.

CHAPITRE PREMIER.

Origine et étude morphologique.

---

1. ORIGINE.

Le bacille, qui fait l'objet de ce travail, a été isolé en novembre 1936, par J. MEYER, Assistant de M. le Doyen A. SARTORY, Professeur de Bactériologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

Il a été trouvé dans un pus dentaire, à côté de la flore microbienne ordinaire. Nous ne croyons pas que ce bacille a joué un rôle dans l'infection. Ceci tout d'abord parce qu'il est dépourvu, comme nous l'exposerons plus loin, de tout pouvoir pathogène et aussi parce que son optimum cultural étant de +27° C., notre organisme ne se multiplie plus à +37° C. Nous croyons bien plutôt qu'il s'agit d'un germe accidentellement introduit dans la bouche du malade, par l'eau de boisson par exemple.

2. ASPECT MORPHOLOGIQUE.

Bacillus Violaceus n. sp. Sartoryi, présente examiné en culture pure, les caractères des Schizomycètes, tels que VUILLEMIN (64) les définit.

a) *Milieu liquide.* Pour étudier ces caractères, nous nous sommes servi d'un milieu liquide que J. SÉVENET avait déjà

employé pour étudier une autre bactérie chromogène, Bac. Citrulli Sartoryi. Toutefois, nous avons substitué la peptone à l'asparagine. Nous appellerons ce milieu: milieu synthétique S. Il se compose de:

Peptone	5 gr.
Phosphate bipotassique	1 gr.
Sulfate de fer	trace
Sulfate de magnésium	0,3 gr.
Chlorure de calcium	0,1 gr.
Chlorure de sodium	0,1 gr.
Glucose	5 gr.
Eau distillée q. s. pour	1000 cm^3

Ce milieu a été ajusté par addition de KOH, après un premier chauffage à 120° C. de cinq minutes à pH = 6 et pH = 7, puis réparti dans des tubes à essais ordinaires, et stérilisé. Les cultures ont été faites à +25° C. Elles ont été examinées à l'objectif à immersion, après coloration par la méthode de May-Gruenewald et de Gram. Des examens ont également été effectués sans coloration préalable entre lame et lamelle et sur des cultures en goutte pendante. Les tubes ajustés à pH = 7 se développent un peu moins rapidement, mais les bacilles offrent le même aspect que ceux cultivés dans les mêmes conditions à pH = 6. Les cultures ont été examinées après un, deux, quatre, huit et quinze jours; les cultures de huit jours offrent l'aspect le plus caractéristique.

Voile: Si nous prélevons un morceau du voile ou de la pellicule violette qui surnage la culture, nous constatons une nette prédominance de *petits éléments*, aux extrémités arrondies; les uns minces et étranglés au milieu, nous apparaissent en forme d'un 8, les autres, un peu plus forts, ont parfois un aspect piriforme ou ovalaire; ce sont les plus nombreux.

Dépôt blanc-violacé: Au fond des tubes de culture, il se forme bientôt un dépôt blanc violacé. Il se compose de *grands bâtonnets fins*, rarement isolés, le plus souvent réunis par deux, bout à bout, plus rarement encore groupés en palissade, rappelant par leur aspect le Pneumobacille de Friedlender. Nous notons également la présence de quelques éléments plus petits, renflés dans leur partie médiane, prenant un aspect fusiforme.

b) *Milieu solide.* Notre milieu liquide additionné de 2% de gélose constitue notre milieu solide. Nous avons également établi des microcultures sur lames gélosées, d'après le procédé très pratique indiqué par Rivalier et Seydel (65). Parallèlement nous avons vérifié les résultats par des frottis effectués sur des cultures du même âge. En voici le mode opératoire: Les lames, nettoyées au préalable à l'alcool et passées à la flamme sont placées par deux dans une boîte de Pétri assez petite (diamètre environ 12 cm.) sur un support en verre en forme d'U. On stérilise le tout dans l'étuve sèche à 180° pendant une heure. Puis à l'aide d'une pince flambée, on retire les lames avec précaution en soulevant légèrement le couvercle de la boîte de Pétri. On les plonge, aussi aseptiquement que possible, pendant quelques instants dans une boîte de Borrel, remplie aux 4/5 de notre milieu gélosé, liquéfié au bain-marie à 60°. On prépare ainsi plusieurs boîtes au fond desquelles on introduit à la pipette cinq centimètres cubes d'eau distillée stérile, pour éviter la dessiccation du milieu. Sur la lame ainsi préparée, on dépose une parcelle petite, mais encore visible de culture. Quand cette dernière est arrivée au développement voulu (dans notre cas après huit jours) il suffit d'enlever la gélose de la partie inférieure de la lame et de délimiter la culture. On dessèche par un séjour de 24 heures à l'étuve à 37° C., la face ensemencée étant en dessous. On enlève alors avec précaution le bouton central de l'ensemencement primitif, on colore et on observe.

Huit jours après l'ensemencement, la culture présente une zone centrale nettement violette et une partie périphérique encore incolore. Dans la partie colorée, nous retrouvons les mêmes éléments que pour le milieu liquide, mais légèrement plus petits. Dans la partie encore incolore, à côté des éléments déjà décrits, nous observons des chaînettes comprenant jusqu'à cinq éléments, et même des filaments plus ou moins allongés.

Au total, nous pouvons dire que notre bacille se présente sous quatre formes, dont les deux premières sont les principales:

a) *éléments bacillaires:* bâtonnents à extrémités arrondies. Ce sont de beaucoup les plus fréquents.

b) *éléments cocco-bacillaires,* quelquefois étranglés

au milieu ou ovalaires et piriformes, surtout dans les cultures sur milieu liquide.

c) quelques petits éléments étranglés en forme de 8.

d) quelques rares éléments fusiformes.

Le polymorphisme de notre bacille est donc manifeste.

Pendant ces examens, nous avons eu l'occasion d'observer, surtout pour les cultures achromogènes sur milieu solide, de curieuses formes d'involution et d'évolution. La forme la plus fréquente est un bâtonnet courbé en équerre, ainsi que de longs filaments étranglés à l'une de leurs extrémités. Plus rarement on observe des éléments bourgeonnants, des filaments avec des ébauches de ramifications ou étranglés à espaces réguliers.

3. MOTILITÉ.

Le mouvement propre de Bac. Violaceus Sartoryi a été soigneusement étudié. Nous avons d'abord examiné des cultures âgées de 8, 24, 48 heures, quatre, huit et quinze jours, sur notre milieu synthétique S liquide, placées, soit à +27° C., soit à la température du laboratoire (environ +20° C.). Les cultures avaient été ajustées au pH optimum 6,2.

Les cultures diluées à l'aide de sérum physiologique et examinées entre lame et lamelle, présentaient toutes des mouvements de rotation et de translation très nets. Nous avons même pu distinguer que seuls les éléments cocco-bacillaires étaient animés d'un vif mouvement giratoire. Les éléments en fuseaux sont également mobiles, tandis que les bâtonnets plus grands sont eux-mêmes immobiles, mais bousculés sans cesse par les vifs mouvements de rotation des éléments plus petits. Afin de constater si ce mouvement était bien dû aux oscillations propres de notre organisme et non au mouvement brownien ou à un entraînement par suite de courants du milieu liquide, nous avons additionné la suspension examinée de quelques gouttes d'une solution de sublimé à 10% ou d'acide phénique à 3%. Nous avons toujours constaté un arrêt brusque de la motilité.

Une autre expérience très intéressante et fournissant une preuve nouvelle de la motilité propre de notre bactérie a été effectuée à l'aide d'un dispositif très ingénieux décrit

par Nepveux (66). Un tube en verre est chauffé dans sa partie moyenne, puis étiré finement à la lampe à environ deux à trois millimètres de diamètre. En étirant on redresse en même temps les deux extrémités à diamètre initial pour obtenir deux branches parallèles.

On introduit dans la partie profonde et fine un bouillon gélatiné à 6%, donc présentant une viscosité assez prononcée; on bouche les deux orifices latéraux et verticaux avec du coton cardé et on stérilise le tout à l'autoclave à 120° pendant quinze minutes. Après refroidissement on introduit stérilement et sans agiter l'appareil: dans une des branches verticales un bouillon phéniqué à 2‰; dans l'autre branche du bouillon ordinaire. On ensemence légèrement dans le bouillon phéniqué, toujours sans agiter, et on place le tout à l'étuve à +27° C. Il se forme alors, 48 heures après, un trouble dans le bouillon ordinaire, tandis qu'aucun développement n'est encore visible dans le bouillon phéniqué, cependant ensemencé initialement. Après quatre jours, une pellicule violette s'est formé au-dessus du bouillon ordinaire; le bouillon phéniqué se trouble seulement. Après six jours, il s'y forme une mince pellicule grise légèrement violacée sur les bords du tube. Nous en concluons que par suite du chimiotaxisme négatif vis-à-vis de l'acide phénique, Bacillus Violaceus Sartoryi, à l'aide de sa mobilité propre, a réussi à traverser relativement rapidement, le liquide gélatiné d'une consistance visqueuse très marquée. De ce fait, il est établi que notre bactérie possède une motilité propre assez prononcée.

4. CILS.

L'existence de cette motilité propre, nous a laissé supposer que notre bacille doit posséder des organes moteurs, que nous voulons caractériser.

Nous avons tout d'abord utilisé dans ce but des cultures très jeunes sur gélose, milieu classique pour la caractérisation des cils bactériens, surtout employée pour le groupe Coli-Typhique. Les cultures ont été placées à +27° C. Nous avons préparé des frottis à plusieurs reprises. Nous n'avons cependant pas réussi, soit par la méthode de Van Ermengem, modifiée par Lasseur, soit par la méthode à la fuchsine de Nicolle et Morax, à mettre en évidence des images, qui pouvaient être considérées incontestablement comme des cils.

De nouveaux essais nous ont paru nécessaires pour la caractérisation de ces organes, qui devaient probablement exister, du moment que le bacille était mobile.

De jeunes cultures, effectuées dans des boîtes de Borrel sur notre milieu synthétique S, dans les conditions qui nous avaient déjà servi dans l'étude de la motilité du bacille, nous ont également donné satisfaction ici. Nous avons prélevé au fil de platine une goutte de culture, qui mélangée à une goutte de sérum physiologique, a été déposée sur une lame bien propre. On étend la culture en inclinant légèrement la lame, de crainte d'arracher les cils en opérant avec une lamelle. Puis on dépose sur la lame soit deux gouttes d'une solution d'argent colloïdal à 5%, soit deux gouttes d'encre de chine centrifugée, et on laisse sécher. A l'examen de ces cultures, nous avons pu constater facilement sur le fond rouge-foncé des préparations au collargol ou sur le fond gris-noir des préparations à l'encre de chine, la présence d'un long cil polaire pour les éléments cocco-bacillaires et d'un, très rarement de deux, cils polaires pour les rares éléments en fuseaux. Les bâtonnets sont toujours dépourvus de tout organe moteur.

5. SIÈGE DU PIGMENT.

Au cours de ces examens nous avons pu constater, que tout le corps bactérien était uniformément coloré en bleu-violacé. Le pigment est donc uniformément réparti sur la totalité du bacille et non pas localisé dans certaines granulations ou enclaves lipidiques, comme pour la prodigiosine. Le pigment reste fixé sur le corps bactérien lui-même; il ne fuse pas dans le milieu ambiant et la masse qui réunit les bactéries en voile n'est pas colorée. Notre organisme se range donc parmi les germes parachromopares de Beijerinck.

Dans des examens plus attentifs, il nous a semblé que le pigment colore surtout la membrane, alors que l'intérieur de la bactérie nous apparaît comme incolore. Ceci a surtout été observé pour les préparations au collargol.

6. SPORES.

Bacillus Violaceus Sartoryi est doué d'une vitalité assez remarquable, puisque des cultures sur milieu liquide ou solide, conservées pendant cinq mois à l'obscurité et à la

température du laboratoire, permettent encore des repiquages très florissants. Il faut cependant à ces cultures un certain temps pour s'amorcer, pouvant aller jusqu'à 48 heures. Nous nous sommes donc demandé si notre germe formait des spores. Dans ce but, nous avons examiné des cultures sur milieu liquide âgées de 8 jours à deux mois. La coloration des spores a été très laborieuse et pour ce faire nous avons employé tout d'abord la *méthode de* Hanzawa *modifiée*, telle que l'indique A. Sartory (67):

1) Fixer par la chaleur en passant 10 à 12 fois dans la flamme ou 1 heure à 180°.
2) Faire agir la solution Lugol 5 minutes.
3) Passage dans l'alcool 2 à 3 minutes.
4) Laver à fond.
5) Colorer à la technique de Ziehl pendant 5 minutes.
6) Effectuer un lavage prolongé à l'eau.
7) Décolorer quelques secondes par l'alcool à 15°.
8) Colorer quelques secondes au bleu de méthylène aqueux.
9) Laver, sécher, monter la préparation. Les spores sont colorées en rouge, les bacilles en bleu.

N'ayant pas obtenu de résultats probants, nous nous sommes adressés à la *Méthode de* L. Heim (68):

> On répartit dans 0,5 cm^3 d'eau distillée quelques gouttes de la culture à examiner. On additionne d'une égale quantité de fuchsine phéniquée, puis on place le tout au bain-marie bouillant pendant 5 à 10 minutes. Un séjour prolongé produirait une coloration trop intense des spores et de la bactérie. On prélève alors quelques gouttes du mélange, que l'on étale sur une lame et on sèche à la flamme. Plonger la préparation quelques instants dans l'alcool à 50° additionné d'une goutte d'HCL, si l'on désire une décoloration plus prononcée. Laver. Colorer au bleu de méthylène aqueux. Laver. Sécher et monter.

En même temps nous avons essayé la *Méthode de* Möller:

1) Les préparations fixées sont recouvertes d'une solution d'acide chromique à 5% pendant 5 à 10 minutes.

2) Laver à l'eau.
3) Recouvrir de fuchsine phéniquée en chauffant doucement une à deux minutes.
4) Laver rapidement 5 secondes dans SO^4H^2 5%.
5) Laver à l'eau.
6) Recolorer 30 secondes au bleu de méthylène aqueux.
7) Laver. Sécher et monter.

Ces deux méthodes ne nous ont pas donné le résultat attendu. A aucun moment nous n'avons pu caractériser des spores sans ambiguité. C'est pourquoi nous avons essayé la *Méthode spéciale de* Schumacker (69), qui devait nous donner des résultats très satisfaisants. Cette méthode recommandée par Buschke et Harry (70) consiste à:

1) Fixer les préparations à la chaleur.
2) Colorer 1 minute avec une solution phéniquée à 1% de bleu de méthylène.
3) Laver à l'eau distillée.
4) Colorer 1 à 2 minutes en agitant constamment avec une solution à 1% de phosphine (diamido-phénylacridine). Les spores sont bleues et les bactéries jaunes.

R. Weiss (71), qui a également employé cette méthode, indique les modifications suivantes, que nous avons également adoptées: la solution de bleu de méthylène phéniquée est portée à 4% de bleu de méthylène et à 1% d'acide phénique. On laisse agir cette solution dix minutes; puis on plonge la préparation, en agitant toujours, et sans laver, pendant deux minutes dans la solution de phosphine.

Nous avons ainsi pu voir de nombreuses bactéries, notamment les éléments bacillaires, avec deux endospores terminales et quelques rares éléments avec une spore centrale. Dans les cultures de huit et quinze jours, les spores sont encore petites pour atteindre leur maximum de développement dans les cultures d'un mois.

7. COLORABILITÉ

Bacillus Violaceus Sartoryi se colore facilement par les colorants d'aniline ordinairement employés. Mais il se décolore très rapidement (trois secondes dans l'alcool) par la méthode de Gram; il est donc strictement *Gram négatif*, comme tous les bacilles violets.

Par la confection du frottis et surtout par la fixation à la chaleur, le bâtonnet s'amincit et une coloration de May-Gruenewald laisse entrevoir de légères condensations polaires, possédant une plus grande affinité pour les colorants. La membrane elle-même se colore bien et se distingue nettement du contenu bacillaire.

Dans nos recherches en vue d'isoler le pigment, nous avons extrait du corps bacillaire une matière grasse, jaune-claire, se rangeant parmi les monoaminomonophospholipides. Dès lors, nous avons pensé à caractériser ce corps gras dans la bactérie même. Depuis longtemps on se sert en histologie, comme réactif des corps gras du «Sudan III» ou «cerasin-rot». A. Sartory (72) préconise le triple colorant de Guéguen, obtenu en dissolvant le sudan III dans l'acide lactique; celui-ci est mélangé au bleu lactique, auquel on ajoute encore une à deux gouttes de teinture d'iode pour dix cm^3. On a ainsi un colorant triple: le protoplasme apparaît en bleu et les graisses en rouge. Pour la coloration il suffit, après fixation, de laisser tomber une à deux gouttes sur la lame. Chauffer jusqu'à émission de vapeurs. Laisser refroïdir, laver à l'eau, sécher et examiner.

Notre bacille prend une teinte bleue uniforme. Pensant alors que la matière grasse pouvait être altérée par la fixation à la chaleur, nous avons repris des colorations en mélangeant simplement une goutte de triple colorant avec une goutte de culture; on chauffe jusqu'à émission de vapeurs, on laisse refroidir et examine entre lame et lamelle. Mais cette manière d'opérer ne nous a pas permi de mette en évidence la présence de corps gras. Il faut donc admettre que le sudan III ne colore pas notre matière grasse, peut-être fixée dans la bactérie elle-même à une molécule protidique.

8. **DIMENSIONS.**

Nous avons déjà vu le grand polymorphisme de notre bacille. Il est donc nécessaire avant d'entreprendre des mesures de la bactérie, de bien définir les conditions dans lesquelles ces mesures ont été prises.

Nous nous sommes adressés à des cultures âgées de huit jours, temps après lequel notre microorganisme a atteint son développement normal. Les cultures ont été faites sur milieu liquide synthétique S. dans les conditions

habituelles de pH = 6,2 et de température de +27° C. Nous avons préparé des frottis *non fixés*, colorés à l'argent colloïdal, tels que nous les avons employés pour la recherche des cils. Ces préparations ont l'avantage de faire apparaître les éléments bactériens sur un fond sombre et d'autre part les préparations n'étant pas fixées, les dimensions observées correspondent à la grandeur naturelle de la bactérie.

1) *Eléments bacillaires:*

2μ9 sur 0μ7

3μ75 sur 0μ6 moyenne:
4μ5 sur 0μ6 3μ7 sur 0μ6.
5μ sur 0μ6

2) *Eléments cocco-bacillaires:*

1μ5 sur 1μ25 moyenne:
1μ6 sur 1μ15 1μ5 sur 1μ25.
1μ3 sur 1μ2.

3) *Eléments fusiformes (rares)*:

2μ5 sur 0μ7

4) *Eléments étranglés en* 8:

2μ7 sur 0μ7.

Pour les formes d'involution, nous avons observé des bâtonnets allongés en filaments sans cloisons, mesurant jusqu'à 15μ sur 0μ7, de même que des chaînettes de 4 à 5 éléments atteignant 15μ.

Chapitre II.

Propriétés biologiques.

Nous savons aujourd'hui que les caractères morphologiques et culturaux, les propriétés physiologiques et biochimiques varient avec les conditions physiques et chimiques dans lesquelles les bactéries sont cultivées. Il est donc indispensable, avant d'aborder l'étude des propriétés biochimiques et culturales, de fixer les conditions les plus favorables à la croissance de notre bacille. L'importance de ces recherches est grande depuis que l'on a reconnu l'influence capitale de la concentration en ions H, par exemple, sur le développement des cultures.

Pour réaliser cette étude, il nous fallait un milieu synthétique, facilement réalisable, contenant des produits stables et purs, satisfaisant aux exigences de notre bactérie. Nous nous sommes servis pour ces expériences de notre même milieu liquide synthétique S. Certes, ce milieu, déjà très favorable, n'est pas le meilleur, ainsi que nous le verrons plus loin, mais il n'est pas nécessaire, à notre avis, de se servir d'un milieu si perfectionné pour l'étude des propriétés biologiques.

1. pH OPTIMUM.

Pour la détermination du pH optimum, nous avons préparé à plusieurs reprises, une série de tubes de culture d'égales dimensions, très soigneusement nettoyés, dans lesquels nous avons réparti dix cm^3 de notre milieu. Les diffé-

rents pH ont été ajustés au moyen de solutions diluées d'HCl et de KOH. Nous avons examinés les pH croissants de 4,6 à 7,4. L'ensemencement a été réalisé au moyen de 0,1 cm^3 d'une émulsion bien homogène d'une culture âgée de 10 jours. Le tout est resté à la température du laboratoire (20° C.).

Dix-huit heures après l'ensemencement, les tubes de pH = 5,1 jusqu'à pH = 6,6 étaient troubles. De même après 24 heures.

Après 48 heures, seul le tube à pH = 4,6 reste clair. Pour pH = 5 et pH = 7,4 on remarque un léger trouble. Pour les tubes ajustés à pH = 5,4; 5,8; et 6,6 on note un trouble plus prononcé, mais seul le tube ajusté à pH = 6,2 commence à se pigmenter. Ces mêmes tubes centrifugés, montrent que le tube pH = 6,2 contient la récolte optima. Une concentration en ions H différente de 6,2 entraîne donc un retard de la croissance, mais reste sans influence sur le pouvoir chromogène, seulement lié à la croissance. Ceci n'est pas toujours le cas. Il est, en effet, possible de trouver un pH optimum pour la croissance différent de celui du pouvoir chromogène. Lasseur et Dupaix (73) le démontrent pour Bacillus Caryocyaneus Beijerinck-Dupaix.

Il est également intéressant de constater qu'après dix jours de culture les tubes ajustés initialement au pH = 5,8, 6,2 et 6,6 sont tous ramenés au pH optimum 6,2. Ce fait a déjà maintes fois été signalé, notamment: Cluzet, Rochaix et Kofman en 1923 (71), Sierakowski, Boehm et Kopaczewski en 1929 (75) arrivent à des conclusions analogues, lorsqu'ils écrivent: «En ce qui concerne les ions H+, il convient de remarquer que, au début de son développement chaque microbe, dans n'importe quel milieu qui ne lui est pas particulièrement propice, commence par ramener ce milieu à une concentration en ions H+ optimale». Cependant, Lasseur (76) écrit en 1931, que ces faits, conformes à la théorie de l'adaptation, ne cadrent pas avec ce qu'il a observé avec Bacillus Chlororaphis et Bacillus Caryocyaneus notamment.

Après trois semaines, nous avons constaté une alcalinisation générale de toutes les cultures, ce qui vérifierait les conclusions de Kopaczewski en 1931 (77) disant que les saprophytes alcalinisent rapidement et fortement les milieux tels que le bouillon.

2. TEMPÉRATURE OPTIMA.

Pour la détermination de la température eugénésique, nous nous sommes servis d'une série de tubes de diamètre rigoureusement identique, remplis de la même quantité de notre milieu S, ajusté à pH = 6,2. Ces tubes, ensemencés à l'aide d'une pipette stérile avec 0,2 cm^3 d'une émulsion homogène de bacilles, sont placés trois par trois aux températures suivantes: + 8°, 15°, 20°, 27°, 32° et 42° C.

A la température de +8° C. aucun développement n'est visible après 10 jours. Cependant après 15 jours, on note un léger trouble vers la surface du liquide ainsi qu'une légère coloration violette; mais la culture même après un mois ne se développe plus. A plus 15° C. on note déjà un léger trouble à la surface du milieu 30 heures après l'ensemencement. Les températures de + 20° et +32° sont également favorables; mais la culture la plus luxuriante est obtenue à +27° C. où nous remarquons un trouble net, 24 heures à peine après l'ensemencement. Quant aux cultures, placées à 37° C., nous n'avons noté aucun développement, même un mois après l'ensemencement. La température culturale optima est donc sensiblement: +27° C.

Au cours de ces expériences, nous avons remarqué le fait important, que la température de culture restait absolument sans influence sur la fonction chromogène. La couleur reste inchangée et l'intensité reste étroitement liée à la luxuriance. Ceci est déjà une première présomption en faveur du rôle important que le pigment doit jouer dans la biochimie de la bactérie. D'autre part toutes les bactéries chromogènes ne se comportent pas ainsi, notamment Bac. Prodigiosus et Bac. Citrulli Sartoryi. Ce dernier ne conserve sa fonction chromogène que jusqu'à +22° C.

3. INFLUENCE DE LA CHALEUR.

Notre bacille, comme tous les bacilles violets, s'est montré très sensible à la chaleur. Des cultures sur notre milieu liquide S, âgées de dix jours, ont été placées successivement, pendant 5 minutes, aux températures de: +45°, 50°, 60°, 70° et 80° C. De chaque culture ainsi traitée, nous avons fait 3 repiquages et seuls les tubes ensemencés avec les cultures maintenues à +45° et +50° C. ont cultivé. Notre bacille est donc déjà tué aux environs de +60° C. Nous avons observé

d'autre part que notre microorganisme peut résister pendant une heure à une température de +40° C.

Bac. Violaceus Macé est plus sensible à la chaleur, puisqu'un séjour d'une minute à + 35° C. suffirait pour tuer 80% des plastides. Le bacille violet pathogène de Gauducheau, par contre, semble d'une sensibilité à peu près égale puisqu'il nécessite pour être tué une température de +56° à 57° C. maintenue pendant quinze minutes.

4. ACTION DE LA LUMIÈRE.

Deux séries de trois tubes, contenant la même quantité de milieu nutritif, ont été ensemencées, toutes choses égales d'ailleurs, avec la même quantité d'une émulsion homogène de bacilles. L'une des séries de trois tubes a été aussitôt entourée d'une double couche de papier noir complètement opaque et placée à côté de la seconde série, exposée à la lumière diffuse, pour réaliser ainsi pour les deux séries les mêmes conditions de température. Ces cultures, examinées à l'obscurité, après deux, trois, six et dix jours avaient toujours atteint un même degré de développement et la même intensité de coloration.

La lumière semble donc sans influence sur la végétation de Bacillus Violaceus Sartoryi.

5. INFLUENCE DE L'OXYGÈNE DE L'AIR.

L'influence de l'oxygène de l'air a été étudiée, sur des cultures en milieu liquide S, ajustées à pH = 6,2 et placées à plus 27° C. Comme pour les expériences précédentes, nous avons préparé un certain nombre de tubes de culture identiques. Puis avant de stériliser ces tubes, nous y avons introduit une couche d'huile de vaseline de 2 cm. de hauteur selon le procédé de Legros, ou pour d'autres tubes une même couche de vaseline, ce qui est encore plus étanche. Ces tubes une fois ensemencés, n'ont montré aucun développement, même après un mois, alors que des tubes témoins, sans huile de vaseline ou vaseline, se développaient normalement.

Bacillus Violaceus Sartoryi est donc un aérobie strict. Ceci d'ailleurs était à prévoir puisque la culture se fait uniquement en surface; le dépôt de fond blanchâtre venant d'éléments du voile superficiel. L'oxygène de l'air est donc

indispensable à la végétation de notre bacille, mais il ne semble pas indispensable à la conservation des germes, car ceux-ci conservés pendant un mois à l'abri de l'oxygène, gardent toute leur vitalité. De tels tubes, débarrassés de la couche d'huile de vaseline par exemple et placés à l'étuve à 27° C., reprennent leur développement normal.

6. ODEUR DES CULTURES.

A plusieurs reprises nous avons été frappés au courant de nos travaux par l'odeur toute particulière de nos cultures sur milieu liquide S, rappelant assez l'odeur de fraises. Macé signale que son bacille violet produit souvent une odeur d'acide butyrique. Bréaudat remarque une odeur d'acétone pour Bac. Violarius Acetonicus. Enfin Gaudcheau note une odeur rappelant celle des amandes amères pour son bacille violet pathogène.

7. POUVOIR PATHOGÈNE.

Comme il existe une espèce pathogène parmi les bacilles violets, nous avons injecté à des cobayes une émulsion d'une culture de 4 jours, faiblement pigmentée:

4 cm^3 en injection hypodermique et

2 cm^3 en injection intrapéritonéale.

Nous n'avons noté ni abaissement de température, ni apparition d'aucun autre phénomène pathologique.

Notre bacille n'est donc pas doué de pouvoir pathogène dans les conditions de l'expérience. Il reste possible que des cultures plus développées, provenant de souches neuves se comportent différemment.

8. VITALITÉ

Des cultures de Bac. Violaceus Sartoryi, sur milieu de Sabouraud gélosé maltosé, âgées de trois mois, conservées à l'obscurité et à la température du laboratoire, repiquées sur notre milieu liquide habituel, donnaient encore une culture violet-noire avec une pellicule bien épaisse.

Notre bacille conserve donc sa vitalité pendant au moins trois mois. Des cultures de quatre mois donnent déjà des résultats variables.

Chapitre III.

Caractères culturaux.

Les caractères culturaux d'un bacille sont essentiellement variables, aussi est-il nécessaire de préciser avec soin le mode opératoire et de décrire minutieusement l'aspect des cultures.

Toutes nos observations ont porté sur un grand nombre de cultures, toujours réalisées dans les mêmes conditions. Nous nous sommes toujours servis de tubes de culture en verre ordinaire et de dimension courante. Les milieux de culture ont été ajustés, après une première stérilisation, au pH optimum de 6,2 à l'aide d'une solution de KOH. Pour l'ensemencement, nous nous sommes servis de cultures homogénéisées, provenant d'un milieu identique à celui à examiner. L'ensemencement lui-même a été effectué au fil de platine. Enfin, toutes nos expériences ont été faites à la température eugénésique de +27° C.

A) MILIEUX LIQUIDES.

I. SOLUTION DE PEPTONE.

BOUILLON SIMPLE.
BOUILLON PEPTONÉ.

Sur ces trois milieux, les caractères culturaux sont à peu de choses près, identiques. La concentration est de 7‰. Vingt-quatre heures après l'ensemencement, nous avons constaté l'apparition d'un léger trouble dans tout le

milieu liquide. Après 18 heures, le trouble s'accentue à la partie supérieure de la culture au voisinage de la surface, où une mince pellicule grisâtre apparaît. Après trois jours, cette pellicule plus dense, tout en adhérant bien aux parois du tube, commence à se pigmenter, surtout sur les bords. Puis les jours suivants, la pellicule plus épaisse se colore toute en violet clair. En même temps le restant de la culture s'éclaircit et un petit dépôt de fond grisâtre se forme.

La pigmentation peut encore s'accentuer après huit jours de culture. Souvent une région centrale plus colorée apparaît alors, sans gagner toute la surface de la culture. Le voile s'épaissit encore, commence à se plisser et bientôt, au dixième jour environ, se détache et tombe au fond. Jamais il ne se forme ni bulles de gaz, ni pigment diffusé dans le milieu liquide.

Ces milieux ne sont pas très favorables, la bactérie cependant s'y développe, mais par repiquage les souches s'affaiblissent rapidement.

II. BOUILLON GLYCÉRINÉ.

C'est le même milieu que précédemment, additionné de 1% de glycérine. Nous retrouvons le même aspect de culture; cependant le voile est plus résistant. La pigmentation apparaît plus vite et plus intense. Après huit jours de culture au moins, le pigment commence à fuser dans le milieu de culture, surtout en dessous du voile. Ceci s'explique par la solubilité du pigment dans la glycérine. Bacillus Violaceus Sartoryi attaque donc la glycérine, mais il profite très peu de cet aliment.

III. BOUILLONS SUCRÉS.

Concentration en sucres: 1,5%. Nous avons étudié l'influence de nombreux sucres, mono et disaccharides. Tous exercent une influence favorable, mais le glucose est le sucre le plus profitable à la bactérie.

Le développement des cultures est le même que pour le bouillon simple pour les premières 24 heures. Puis dès le deuxième jour, le voile déjà assez compact et adhérent aux parois du tube, se pigmente. Après le troisième jour la pigmentation est complète et la culture est d'un beau violet clair. Le trouble disparaît, le milieu de culture s'éclaircit et

au fond du tube, se forme un léger dépôt grisâtre. Le voile est encore lisse. Après cinq jours, il commence à se plisser. Le voile, très brillant et violet-noir, se détache alors des parois et gagne le fond du tube.

Par suite de nombreux repiquages, les cultures sur bouillons sucrés, deviennent de plus en plus irrégulières, la pigmentation de plus en plus faible, comme pour les cultures sur bouillon simple. Le voile n'adhère plus aux parois du tube et tombe au fond sans coloration aucune. Nous obtenons, après quelques repiquages encore, des cultures complètement achromogènes. Ceci semble être un fait commun à tous les bacilles violets et chromogènes en général: Macé, Hartley, Lasseur et Friedheim signalent tous cette propriété.

IV. BOUILLONS GLYCÉRINÉS AMIDONÉS OU DEXTRINÉS.

Ce sont des milieux dilués, auxquels nous nous sommes adressés pour conserver à notre germe son pouvoir chromogène. Avant nous, Macé et Lasseur avaient déjà signalé la pomme de terre glycérinée, Hartley les milieux à l'amidon, pour régénérer le pouvoir chromogène de leurs bacilles violets. Nous avons obtenu après de nombreux essais, les meilleurs résultats avec un milieu dextriné, tel que nous le décrirons au moment de l'étude de la fonction chromogène.

Les caractères culturaux sont semblables à ceux sur bouillon glucosé, mais la culture est plus luxuriante encore et ne perd pas sa fonction chromogène.

V. LAIT.

Sera étudié au moment de l'examen des propriétés biochimiques.

B) MILIEUX SOLIDES.

I) BOUILLON GLUCOSÉ GÉLOSÉ.

SABOURAUD MALTOSÉ GÉLOSÉ.

Sur ces deux milieux, Bacillus Violaceus Sartoryi présente les mêmes caractères culturaux, avec un léger retard sur Sabouraud maltosé.

Vingt-quatre heures après l'ensemencement, il apparaît le long de la strie un mince filet transparent et humide; les bords droits prennent un contour sinueux et légèrement surélevé après le deuxième jour. En même temps la culture s'étend un peu plus et prend une teinte grisâtre. Puis vers le quatrième jour la culture commence à se pigmenter, surtout au début de la strie où l'ensemencement est le plus riche, pour gagner peu à peu toute la longueur de la strie. La culture a atteint à ce moment son maximum de développement en surface. Après dix jours environ, la culture fonce encore de couleur et prend un aspect plissé.

Sans qu'on en puisse saisir la cause, la pigmentation peut n'apparaître que plus tard ou même faire défaut dans certaines parties de la culture, nettement délimitées. Ce fait a déjà été signalé par Macé pour son bacille violet. La culture est uniquement superficielle et ne pénètre pas dans la gélose.

Des races achromogènes se développent très irrégulièrement en milieu gélosé et n'y retrouvent nullement leur pouvoir chromogène.

II. MILIEUX GÉLATINÉS.

Gélatine en plaque: Les colonies se développent rapidement et atteignent en général leur maximum après trois jours. Le milieu est donc très favorable. L'aspect des cultures est le même que sur gélose. Mais en même temps que la culture commence à se colorer, on observe une liquéfaction assez rapide de la gélatine; le centre de la culture s'affaisse, une pellicule violet-foncé surnage le liquide. Cette pellicule se plisse bientôt, tout en s'épaississant, puis la liquéfaction est complète. La gélatine liquéfiée reste transparente et après un temps plus ou moins long le voile superficiel se détache et gagne le fond de la boîte de Pétri.

Nous n'avons jamais perçu une odeur d'acide butyrique, comme le décrit Macé.

Gélatine en piqûre: Nous n'avons jamais observé de développement le long de la piqûre. Le bacille se développe seul à la surface libre du tube de culture, et entraîne une liquéfaction rapide du milieu. La pigmentation est assez intense, ce qui semble encore différencier notre germe de Bacillus Violaceus Macé.

Les caractères culturaux sont, une fois la liquéfaction commencée, les mêmes que pour les cultures sur bouillon sucré.

III. POMME DE TERRE GLYCÉRINÉE.

Ce milieu est très intéressant pour la culture de notre bacille. De nombreux auteurs, Macé, Lasseur, Hartley, ont préconisé des cultures sur pomme de terre glycérinée pour redonner, en partie du moins, le pouvoir chromogène à des races de leurs bacilles violets, devenues achromogènes. Nous avons pu refaire la même constatation pour notre bacille.

La culture est plus lente à apparaître; la pomme de terre se recouvre alors d'un enduit hyalin brillant, puis une teinte violacée envahit souvent toute la pomme de terre, qui passe bientôt au violet-noir. Par la suite l'aspect vernissé disparaît, le tout se dessèche et prend un aspect plus mat.

C) MILIEUX SYNTHÉTIQUES.

Comme nous venons de le décrire:

1) Notre bacille cultive mieux sur des milieux liquides que sur des milieux solides.

2) Les caractères morphologiques sont plus nets et plus spécifiques sur les milieux liquides.

3) Enfin la fonction chromogène est plus intense sur les milieux liquides, exception faite pour la pomme de terre glycérinée. D'autre part la récolte est plus abondante et l'extraction du pigment plus facile.

Pour l'étude des propriétés biochimiques et surtout en vue de l'extraction de la matière colorante nous avons donc adopté un milieu liquide synthétique fixe. Après de nombreuses tentatives, nous avons employé notre milieu synthétique S, tel que nous l'avons décrit précédemment, pour nos recherches des propriétés biochimiques. Pour les cultures entreprises en vue de l'extraction de la matière colorante, nous nous sommes arrêtés, après de multiples recherches, que nous reprendrons au moment de l'étude de la fonction chromogène, au milieu synthétique D, suivant:

Peptone desséchée Merck	5 gr.
Glucose	2 gr.
Dextrine	5 gr.
Chlorure de calcium	0,1 gr.
Sulfate de magnésium	0,3 gr.
Phosphate bipotassique	1 gr.
Chlorure de sodium	0,1 gr.
Glycérine	1 gr.
Sulfate de fer	trace
Eau distillée q. s. pour	1000 cm^3

Sur ces milieux nous avons obtenu des résultats de luxuriance et de vitesse de culture en tous points au moins égaux à ceux obtenus sur bouillon sucré.

Chapitre IV.

Étude des propriétés biochimiques et de l'influence des éléments nutritifs

Afin de définir plus exactement Bacillus Violaceus Sartoryi et permettre sa différenciation nette avec les autres germes chromogènes violets, nous avons étudié systématiquement ses propriétés biochimiques. Nous analyserons ensuite, l'influence d'un certain nombre d'éléments minéraux, de composés hydrocarbonés et azotés sur le métabolisme et la chromogénèse pour élucider quelque peu la nature et le rôle du pigment.

I. PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES.

1. PROPRIÉTÉS PROTÉOLYTIQUES.

a) *Action sur la gélatine.* Comme nous venons de le décrire à propos des caractères culturaux, notre bacille liquéfie assez rapidement la gélatine. En piqûre, nous obtenons seulement une colonie de surface, se colorant en violet intense après le quatrième jour. La liquéfaction continue pendant que la colonie surnage le milieu liquéfié, et progresse alors même que la pellicule superficielle a déjà gagné le fond du tube.

Sur gélatine peptonée en tube incliné, la liquéfaction est encore plus rapide. A aucun moment nous n'avons pu remarquer une diffusion de la matière colorante dans le milieu liquéfié.

b) *Action sur le sérum coagulé.* Sur ce milieu notre microorganisme pousse moins vite que sur gélatine. La culture d'abord grêle, se développe peu à peu en surface. De coloration blanche, elle passe seulement après six à huit jours de culture à une coloration rose-violacée. En même temps on note une liquéfaction lente du sérum. Le sérum coagulé est donc un milieu moins favorable à la croissance de notre bacille.

c) *Action sur le blanc d'œuf.* Généralement l'attaque de la gélatine est plus prononcée chez les bactéries que l'attaque des autres matières protéolytiques et surtout des albumines coagulées. Dans des tubes contenant un centimètre cube de bouillon de viande ajusté au pH = 6,2, nous avons introduit des cubes de blanc d'œuf coagulés par la chaleur et stérilisés à l'autoclave pendant dix minutes à 115° C. pour éviter leur attaque par la chaleur. La partie inférieure des cubes baigne seule dans le bouillon de viande, ce qui évite sa dessiccation. On ensemence avec précaution sur le blanc d'œuf.

Après deux jours de culture à +27° C. la partie du cube, émergeant du bouillon se colore en violet, puis dès le troisième jour, la zone de blanc d'œuf immédiatement au voisinage de la culture, devient transparente et ne se liquéfie que très lentement. Tout le phénomène protéolytique s'arrête là, pendant que la culture elle-même prend une belle teinte violet-foncé

2. ACTION SUR LES SUCRES.

Nous examinerons en détail à la fin de ce chapitre l'action de Bacillus Violaceus Sartoryi sur les sucres, soit seuls, soit en présence de matières quaternaires. A présent, nous dirons seulement que les sucres seuls ne sont pas attaqués. En présence de matières quaternaires tous les sucres examinés sont attaqués, mais toujours sans production de gaz. Nous avons examinés: mannite, dulcite, saccharose, maltose, lactose, galactose, glucose et lévulose.

Nous n'avons jamais observé une acidification du milieu. Pour ce faire, nous avons eu recours au procédé de Grimbert et Legros. Ces auteurs emploient un bouillon carbonaté avec un tube à hémolyse où viennent se rassembler les gaz provenant de la décomposition du carbonate par les acides pouvant se former dans le milieu de culture.

3. ACTION SUR LE LAIT.

Le lait utilisé était du lait partiellement écrémé, additionné de teinture de tournesol et stérilisé par chauffage de cinq minutes à 115° C. pour éviter une décomposition de la caséine.

Après deux jours, le lait coagule immédiatement en-dessous du voile, qui commence à se former. La coloration du tournesol ne change pas. La caséine coagulée gagne le fond. La culture se développe encore un peu. On note une dissolution partielle de la caséine, puis après quelques semaines de culture le tournesol vire au bleu-foncé. Bacillus Violaceus Sartoryi secrète donc une caséase agissant en milieu neutre.

4. ACTION SUR LES NITRATES.

Le milieu classique:

Peptone Chapoteaut	10 gr.
Chlorure de sodium	5 gr.
Nitrate de potassium	1 gr.
Eau distillée q. s. pour	1000 cm^3

a été ensemencé et cultivé pendant cinq jours dans les conditions habituelles. Cette expérience a été reprise plusieurs fois. Jamais nous n'avons pu ni obtenir une culture sensible, ni mettre en évidence la réduction des nitrates en nitrites.

5. ACTION SUR LE ROUGE NEUTRE.

Nous avons employé la méthode du tube «B» indiquée par Besson, Ranque et Senez, qui est d'un emploi très simple et très pratique. L'expérience est faite avec le milieu de culture suivant:

Eau de viande de bœuf	1000 cm^3
Glucose	4 gr.
Solution aqueuse de rouge neutre	3 cm^3

On répartit dans des tubes à essais assez larges et contenant un tube à hémolyse renversé, qui sert de cloche de fermentation. Après stérilisation, on ensemence et on place la culture à l'étuve; on peut alors apprécier:

a) les phénomènes de réduction du rouge neutre;

b) les phénomènes d'acidification et d'alcalinisation du milieu;

c) la production ou la non production de gaz avec le glucose.

Les germes, qui sans réduire, acidifient le milieu, font virer la couleur à une teinte amarante; l'alcalinisation produit au contraire une teinte rose-saumon ou porto. La réduction se traduit par une fluorescence.

Pour notre bactérie, nous avons obtenu les résultats suivants: après quatre jours de culture, on observe une réduction nette, puis une très légère alcalinisation, qui très lentement gagne la plus grande partie du tube. Pas de production de gaz.

6. RECHERCHE DE L'INDOL.

Le bacille a été ensemencé sur une solution de peptone Chapoteaut à 5%. Après cinq jours de culture, nous avons ajouté au milieu de culture *filtré*, un centimètre cube de solution de nitrite de potassium à 1‰ et huit à dix gouttes d'acide sulfurique pur concentré. On agite, puis on porte la partie supérieure du tube à l'ébullition: il apparaît alors une coloration rose très nette. On peut ajouter deux centimètres cubes d'alcool amylique; après agitation et séparation des deux liquides, on note une coloration rose très nette de la couche alcoolique. Un tube témoin ne donne pas ces colorations. La production d'indol est donc manifeste.

Dans la suite de nos expériences, nous nous sommes demandés si un dérivé de la substance chromogène, incolore dans les conditions de l'expérience, ne pouvait pas provoquer cette coloration. On aurait pu distiller le milieu, l'indol étant volatil, mais rien ne nous garantit que la substance chromogène ne passe également dans le distillat. C'est pourquoi nous avons repris cette expérience avec la substance chromogène elle-même. Dans ces conditions nous n'avons obtenu qu'une coloration jaune-pâle.

Nous avons également caractérisé l'indol à l'aide du réactif d'Ehrlich-Grossoni à la para-diméthylaminobenzaldéhyde. Après trois semaines de culture sur eau peptonée préparée selon la technique habituelle on prélève cinq centimètres cubes de culture filtrée dans un tube à

essais. On humecte la face inférieure d'un tampon de coton avec cinq gouttes d'une solution à 1% du réactif d'Ehrlich-Crossononi. Après avoir enfoncé le coton jusqu'à 4 à 5 centimètres au-dessus du liquide on place le tube dans de l'eau bouillante. On observe peu de temps après une belle teinte rouge propre à l'indol.

Cette formation d'indol distingue nettement Bacillus Violaceus Sartoryi de Bacillus Violaceus Macé, qui selon Macé, Schrötter *et* Migula *ne produit pas d'indol.*

7. RECHERCHE DE L'HYDROGÈNE SULFURÉ.

Un grand nombre de bactéries produisent de l'hydrogène sulfuré aux dépens des albuminoïdes. C'est un caractère très important pour le diagnostic des bactéries.

Nous avons examiné des cultures sur notre milieu synthétique S. Les tubes étaient fermés au moyen d'un bouchon en liège, auquel est fixé une bande de papier filtre, imbibée d'une solution d'acétate de plomb à 10%, puis séchée. Le tout est stérilisé, puis ensemencé, d'après la technique de Walther. Un noircissement du papier réactif n'a jamais été observé, même après vingt jours de culture. Nous pouvons donc affirmer que notre bactérie ne produit pas d'hydrogène sulfuré.

II. INFLUENCE DES ÉLÉMENTS NUTRITIFS.

A. INFLUENCE DES ÉLÉMENTS MINÉRAUX:

PHOSPHORE, MAGNÉSIUM ET FER.

Le rôle des éléments minéraux dans la nutrition des bactéries et leur chromogénèse est reconnu depuis fort longtemps. Pasteur utilisait pour des cultures de levures un mélange minéral mal défini, appelé «cendres de levure». Ad. Meyer en 1869, et Raulin en 1870 (79) établirent avec plus de précision l'influence d'éléments minéraux variés dans la végétation des levures. Gessard, le premier, reconnut l'influence du phosphore et du magnésium sur les bactéries chromogènes. Plus récemment Lasseur et ses élèves (80) affirment à nouveau l'influence de ces deux éléments sur Bac. Caryocyaneus et établissent nettement, ainsi que Bortels, l'influence du fer (81) sur Bac. Prodigiosus en 1931. Antérieurement ces mêmes auteurs avaient étudié l'influence

du fer sur Bac. Chlororaphis, Bac. Caryocyaneus et Bac. Le Monnieri Lasseur.

Pour ces recherches, nous nous sommes servis de notre milieu synthétique S, légèrement modifié. La peptone est remplacée par l'asparagine. Notre milieu de base est donc le suivant:

Asparagine	2 gr.
Glucose	5 gr.
Chlorure de calcium	0,1 gr.
Chlorure de sodium	0,1 gr.
Eau distillée q. s. pour	500 cm^3

Ce milieu concentré est réparti dans trois séries de vingt tubes, soigneusement lavés et rincés avec de l'eau bidistillée. Nous avons tenu compte des précautions à prendre et des causes d'erreur à éviter, indiquées par Lasseur. Dans ces tubes, contenant 5 cm^3 de ce milieu, on ajoute une quantité égale d'une solution:

pour la série sans PO^4	Sulfate ferreux	trace
	Sulfate de magnésium	0,3 gr.
	Eau dist. q. s. pour	500 cm^3
pour la série sans Mg.	Sulfate ferreux	trace
	Phosphate bipotassique	1 gr.
	Eau dist. q. s. pour	500 cm^3
pour la série sans fer	Sulfate de magnésium	0,3 gr.
	Phosphate bipotassique	1 gr.
	Eau dist. q. s. pour	500 cm^3

Après agitation ces tubes sont stérilisés comme d'habitude et ensemencés avec le moins de culture possible à l'aide d'un fil de platine ou mieux d'une pipette stérilisée. Après trois repiquages, nous n'obtenons plus aucun développement sur les milieux sans phosphore. Le phosphore est donc nécessaire à la vie de Bacillus Violaceus Sartoryi. Ceci d'ailleurs est un fait général de la vie des bactéries. Nous n'avons pas étudié l'influence de traces de phosphore.

Pour les cultures sans magnésium, nous obtenons, après 1 à 5 repiquages au moins, des cultures incolores, mais également très grêles. A l'aide de ces cultures achromogènes et encore assez vigoureuses, nous avons examiné l'apport tardif

de magnésium, tel que Lasseur le préconise. Après 18 heures nous avons pu constater une nette recoloration des cultures, qui deviennent plus abondantes et plus fortes. Il semble donc que le magnésium n'est pas aussi indispensable que le phosphore à la vie de la bactérie, mais nécessaire à la production du pigment.

L'influence du fer est plus complexe et les résultats obtenus ne sont pas toujours concordants. Nous avons repris ces expériences un grand nombre de fois. Alors que souvent nous n'avions plus après cinq à six repiquages, que de très légères cultures, pas absolument incolores, toute végétation cessant pour les repiquages suivants, il nous est arrivé de constater à deux reprises différentes, l'apparition d'une fluorescence vert-jaunâtre. Il est possible que ces résultats parasites soient dûs à une impureté accidentelle, ou à l'introduction de germes étrangers. Cependant à l'examen microscopique nous n'avons rien constaté d'anormal.

L'apport tardif de traces de fer, dans ces deux sortes de cultures, n'a pas provoqué la formation du pigment violet. Le résultat négatif de cet apport ne suffit pas à nos yeux, à prouver que le fer ne joue aucun rôle dans la chromogénèse, car les cultures incolores n'étaient peut-être plus assez fortes pour recommencer à sécréter le pigment. Il faut remarquer aussi que des souches repiquées souvent et rapidement sur notre milieu synthétique S et sur bouillons sucrés contenant tous les éléments minéraux, perdent également leur vitalité, mais moins rapidement.

Pour établir clairement l'influence du fer, non seulement sur la vitalité, mais surtout sur le pouvoir chromogène, il faudrait obtenir sur des milieux sans fer, des souches achromogènes, possédant encore toute leur vitalité et capables par ce fait, de se colorer par apport tardif de l'élément minéral faisant défaut.

B. INFLUENCE DES MATIÈRES HYDROCARBONÉES ET AZOTÉES.

Nous examinerons successivement:

1° Cultures sur milieux minéraux, renfermant comme source d'azote un sel ammoniacal minéral;

2° cultures sur milieux minéraux, renfermant comme

source d'azote un acide aminé, une amide, un sel ammoniacal d'acide organique;

3° cultures sur milieux minéraux, sans azote, en présence d'alcool polyatomiques ou de sucres;

4° cultures sur milieux minéraux renfermant à la fois des substances quaternaires minérales ou organiques et des sucres.

Le milieu minéral de base pour ces expériences a toujours été le suivant:

Phosphate bipotassique	1 gr.
Sulfate de magnésium	0,3 gr.
Chlorure de sodium	0,1 gr.
Chlorure de calcium	0,1 gr.
Sulfate ferreux	trace
Eau distillée q. s. pour	1000 cm^3

A ce milieu nous avons ajouté pour chacun des cas à étudier, la substance minérale ou organique dont nous avons voulu constater l'influence sur le bacille. Toutes les cultures ont été faites dans les conditions optima de pH et de température.

1° *Cultures sur milieux minéraux, renfermant comme source d'azote un sel ammoniacal minéral.*

Dans nos cultures précédentes, nous avons déjà constaté que la teneur optima en azote, en présence de glucose est de 2,5‰ pour le succinate d'ammonium. Les titres des solutions de sels ammoniacaux ont été pour ces raisons fixés à une teneur en azote identique à celle du milieu initial de succinate d'ammonium. Dix gouttes renferment 0,011 gr. d'ammoniaque et sont ajoutées à dix centimètres cubes du milieu de base.

Nous avons examiné les sels suivants, renfermant l'azote tantôt comme anion tantôt comme cathion ou les deux à la fois. Les titres des solutions figurent entre parenthèses.

Carbonate d'ammonium	(6,5%)
Chlorure d'ammonium	(7,6%)
Sulfate d'ammonium	(9,4%)
Nitrate de sodium	(12 %)
Nitrate d'ammonium	(5,6%)

Sur tous ces milieux, nous n'avons jamais pu obtenir un développement de notre bacille.

2° *Cultures sur milieux minéraux, renfermant comme source d'azote un corps azoté organique.*

Les conditions d'utilisation des sels ammoniacaux organiques étant les mêmes que les précédentes, nous utiliserons pour chacun d'eux les quantités calculées pour obtenir des solutions de titre ammoniacal toujours identique. Pour les acides aminés ils ont été incorporés au milieu minéral à un titre tel qu'il renferme la même quantité d'*azote*, que 0,011 gr. d'ammoniaque. Nous nous sommes adressé aux corps suivants:

Succinate d'ammonium	(10 %)
Oxalate d'ammonium	(8 %)
Guanidine	(5,3%)
Asparagine	(8,5%)
Glycocolle	(10 %)
Tyrosine	(23 %)

Encore ici toutes nos expériences sont restées négatives. On remarque cependant en léger début de développement pour les premières cultures sur succinate et sur asparagine, rendu possible par l'apport de substances hydrocarbonées lors de l'ensemencement. Nous voyons donc que le développement de notre bacille est impossible sur des milieux azotés, dépourvus de produits hydrocarbonés ou d'alcools polyatomiques.

Dans son étude de Bacillus Citrulli Sartoryi, J. Sevenet voyait dans cette impossibilité pour son bacille de satisfaire son métabolisme dans les conditions que nous venons d'exposer, une confirmation de l'absence de tout pouvoir protéolytique. Or, nous venons de constater également le défaut de développement de notre organisme sur milieux azotés dépourvus d'hydrates de carbone et cependant le pouvoir protéolytique de notre bactérie est très intense. Ceci est dû, à notre avis, à la nécessité de la présence des sucres à côté de l'élément azoté. La bactérie secrètera alors les ferments protéolytiques en question.

3° *Culture sur milieux minéraux sans azote, en présence d'alcools polyatomiques ou de sucres.*

Les milieux ont été préparés en ajoutant stérilement dix

centimètres cubes de notre milieu de base double à des séries de tubes tyndalisés, contenant dix centimètres cubes d'une solution à 6% des différents hydrates de carbone. La tyndalisation a été effectuée par un chauffage d'une heure à 60° C. pendant quatre jours consécutifs. Chaque tube de culture contient un petit tube à hémolyse renversé, pour observer le dégagement de gaz carbonique au cours de l'attaque des sucres. Nos recherches ont porté sur les corps suivants: glycérine, mannite, dulcite, saccharose maltose, lactose, galactose, glucose et lévulose.

Tous ces essais sont restés négatifs. Un très faible développement s'est manifesté pour les premières cultures sur les milieux glucosés et saccharosés, dû à l'apport de matières azotées à l'ensemencement.

Nous voyons donc que la glycérine et les sucres étudiés sont encore inaptes à l'assimilation de notre bacille, en l'absence d'azote

4° *Cultures sur milieux minéraux renfermant à la fois des substances quaternaires minérales ou organiques et des sucres.*

Chaque tube de culture renferme:

XV gouttes de solution azotée

7,5 cm^3 de milieu minéral double

7,5 cm^3 de solution tyndalisée de sucre à 3%.

Nous avons étudié les mêmes corps azotés que précédemment, plus la peptone, avec les sucres suivants: Glucose, lévulose, galactose, glycérine, saccharose, lactose et maltose.

Dans aucun cas les cultures renfermant soit nitrate de sodium soit nitrate d'ammonium ne se sont développées, sauf pour les cultures sur glucose où un très léger développement sans coloration a pu être observé. Parmi les sels ammoniacaux minéraux c'est le chlorure d'ammonium, qui a toujours donné les meilleurs résultats. Pour l'azote organique, le glycocolle et la guanidine sont de mauvais aliments, tandis que le succinate d'ammonium et l'asparagine sont les meilleurs aliments azotés, à côté de la peptone.

Pour ce qui est de l'assimilation des sucres, nous savons déjà que nous ne constatons aucune acidification du milieu;

en outre nous n'avons jamais observé un dégagement gazeux quelconque. Nous ne sommes donc en présence ni de la fermentation lactique, ni alcoolique, ni butyrique.

Tous les sucres ne sont pas des aliments de même valeur pour notre microorganisme. Pour les sucres simples, l'ordre d'assimilation est le suivant: glucose, lévulose et galactose. Alors que sur les milieux glucosés, nous obtenons partout un voile nettement coloré après six jours, sauf pour les milieux renfermant des nitrates, les milieux galactosés ne forment un voile nettement violet qu'avec asparagine, peptone et succinate. Pour les autres sucres, l'ordre d'importance est: saccharose, maltose et lactose. Toutefois le saccharose n'est pas aussi favorable que le glucose, qui est de beaucoup le meilleur aliment hydrocarboné.

Le rôle de la glycérine est plus délicat à établir. Grâce à la solubilité du pigment dans la glycérine, les cultures deviennent bleu-violacées après une dizaine de jours, mais le développement est bien plus lent que sur milieu glucosé. La glycérine ne saurait donc être considérée comme aliment normal et de choix, toutefois son attaque est certaine.

Chapitre V.

Étude du pouvoir chromogène.

Le pouvoir chromogène a été considéré longtemps, comme une propriété essentiellement variable de la plastide bactérienne. Il pouvait être maximum, faible ou nul. On n'avait pu préciser les facteurs agissant sur lui.

Lasseur, en étudiant le rôle de divers électrolytes à l'état de traces, l'action de la nature et de la surface des parois des vases de culture, l'influence de la lumière, de la température et du pH du milieu est incontestablement l'auteur qui a le plus contribué à définir les conditions de production des pigments.

ACTION DES PAROIS.

L'influence de la nature du verre des vases de culture intervient également pour notre bacille. Le verre de réaction alcaline est nettement favorable. C'est ce qui explique l'apparition d'une zône pigmentée le long des parois, plus vite que sur le restant de la culture. Ce phénomène est encore accentué en lavant les vases avec une solution alcaline. Si au contraire, on lave avec une solution acide, la culture commence à se colorer au centre et non sur les bords.

La relation entre la hauteur du tube et de la surface de culture est également d'une certaine importance. Nous avons souvent remarqué qu'une même quantité de milieu ensemencée, toutes choses égales d'ailleurs, dans un tube à essais ou dans une boîte de Roux, se pigmente plus vite dans le tube à essais. Ceci a plusieurs causes. D'abord, la petite surface

du tube à essais est plus rapidement peuplée de bacilles et le voile se forme plus tôt. Par ce fait, les bacilles n'ayant pas eu à se multiplier autant que pour les cultures en boîte de Roux, sont restés plus vigoureux. Une autre cause est à chercher dans la plus grande difficulté pour les bacilles d'amener une grande surface au pH voulu.

CONSISTANCE DU VOILE.

Notre microorganisme forme un voile coloré à la surface libre des milieux de culture. La pigmentation est en étroite relation avec l'adhérence et la consistance de ce voile.

L'adhérence dépend de la nature des parois et aussi de l'adhérence des bacilles entre eux. Au fur et à mesure des cultures une même souche forme des voiles de plus en plus fragiles et par suite de moins en moins adhérents. Ceci a été constaté sur tous nos milieux usuels. En même temps le voile devient de plus en plus mince et les cultures se colorent moins.

Ces faits ont également été observés pour d'autres bacilles violets, notamment pour Bac. Violaceus Macé. Ils montrent que la diminution du pouvoir chromogène est en relation avec la vitalité.

RACES ACHROMOGÈNES.

Si nous continuons à répiquer de telles souches déjà affaiblies, elles finissent par ne plus se colorer du tout. Nous avions cru que ce défaut de pigmentation était simplement dû à la trop faible consistance du voile. Ce dernier n'adhérant plus, gagnait le fond avant d'avoir pu se colorer. Il nous semblait donc possible, sinon de régénérer le pouvoir chromogène, du moins d'obtenir des cultures encore colorées, en maintenant le voile à la surface. Pour ce faire nous avons repris un procédé indiqué par J. Meyer, consistant à parsemer la surface du milieu de petits morceaux de liège. De cette manière nous avons bien obtenu un voile mais ce dernier est resté incolore. Nous étions donc en présence de races strictement achromogènes.

RÉGÉNÉRATION DU POUVOIR CHROMOGÈNE.

A l'aide des cultures achromogènes nous avons cherché à régénérer le pouvoir chromogène. Nous nous sommes d'abord assuré que nous avions bien à faire à des races réellement achromogènes. Des cultures en tube à essais sont restées strictement incolores. Nous avons cependant noté une dimi-

nution rapide de la luxuriance de nos cultures. Tout en considérant que cette diminution de la vitalité est un fait banal dû au repiquage intensif nous nous sommes bien demandé si notre milieu contenait bien tous les éléments nécessaires à la chromogénèse ou s'il ne contenait pas un élément empêchant peu à peu la chromogénèse.

Nous avons d'abord essayé un milieu de concentration double, nous avons obtenu des cultures peut-être un peu plus rapides mais aucune régénérescence du pouvoir chromogène. Nous nous sommes donc adressé à des milieux différents. Un repiquage sur notre milieu synthétique gélosé donne des cultures incolores. Sur milieu de Sabouraud maltosé gélosé, notre bacille ne se développe plus qu'irrégulièrement. Sur milieu synthétique I Merck il retrouve une faible partie de son pouvoir chromogène.

De nombreux auteurs ont déjà recommandé les repiquages sur pomme de terre glycérinée pour rendre le pouvoir chromogène aux bacilles violets. Macé, Hartley et Lasseur notamment recommandent ce procédé et indiquent comme très favorables à la production du pigment les milieux à base de lactose ou d'amidon. Nous avons vu précédemment que le lactose n'exerce aucune action favorable sur la chromogénèse de Bacillus Violaceus Sartoryi. Il n'en est pas de même de l'amidon. Des repiquages de nos souches achromogènes sur notre milieu synthétique S additionné de 5‰ d'amidon et de 2‰ de glycérine donnent des cultures plus luxuriantes avec un épais voile violet-noir. Il en est de même pour des repiquages sur pomme de terre glycérinée. Un seul passage suffit pour faire retrouver à notre bacille la majeure partie du pouvoir chromogène.

L'influence de l'amidon et de la glycérine est donc manifeste. Normalement l'amidon est transformé en glucose; il nous a donc semblé intéressant d'étudier le développement de notre bacille sur notre milieu synthétique S, modifié de la façon suivante:

a) milieu «S» additionné de glycérine 3‰

b) milieu «S» additionné d'amidon 5‰

c) milieu «S» additionné de glycérine et d'amidon

d) milieu «S» où le glucose est remplacé par amidon et glycérine.

Les cultures a) sont restées achromogènes.

Après quatre jours:

b) donne une culture pigmentée, mais le voile se désagrège encore assez facilement;

c) cultures de même aspect mais avec un voile plus résistant;

d) culture légère achromogène;

Après dix jours:

b) et c) sans changement mais

d) culture abondante de même aspect que c).

De ces expériences nous pouvons conclure:

La glycérine, sans intéresser directement la chromogénèse, joue un rôle favorable en renforçant la consistance du voile. L'amidon par contre semble indispensable pour régénérer le pouvoir chromogène. Le rôle du glucose n'est que secondaire. La culture d) en effet retrouve son pouvoir chromogène malgré l'absence de glucose dans le milieu initial. Le retard de cette culture d'environ six jours, semble dû au fait suivant: la bactérie achromogène attaque lentement l'amidon et produit peut-être du glucose en dégradant l'amidon par le stade maltose. Le temps nécessaire à ce processus causerait le retard. La bactérie ayant maintenant du glucose à sa disposition, se multiplie et retrouve son pouvoir chromogène grâce à la présence d'amidon non encore transformé. Cette hypothèse suppose la présence de maltase. La recherche de la maltase est relativement aisée, car elle nécessite la présence d'ions chlore pour agir. Mais des cultures sans ions chlore ont également manifesté une nette reprise du pouvoir chromogène. Il reste pour expliquer le retard des cultures sans glucose, l'hypothèse admettant qu'il faut un certain temps à la bactérie pour changer son métabolisme, précédemment lié à la présence de glucose et l'adapter à l'attaque de l'amidon.

RÔLE DE LA DEXTRINE.

L'amidon est un corps très complexe encore mal connu. De plus il n'est jamais pur. Les amidons d'origine végétale sont toujours accompagnés des impuretés les plus diverses (82). W. S. Reich et A. F. Damansky donnent: 0,3% de cendres,

surtout des phosphates et des silicates et 0,1 à 0,2% d'azote. Les phosphates ne semblent pas intervenir puisque notre milieu S en contient. Ce phosphore pourrait aussi venir d'un phospholipide, c'est ce qui nous a conduit à examiner l'action de la lécithine. Dans une autre série d'expériences nous avons examiné l'influence des silicates. Tous ces essais sont restés négatifs. Dans l'impossibilité d'étudier toutes les impuretés de l'amidon, nous avons essayé toute une gamme d'amidons et de produits de dégradation, pour voir si l'amidon lui-même et non ses impuretés était bien l'agent de régénérescence du pouvoir chromogène.

A cet effet nous avons entrepris des cultures sur milieu S sans glucose, contenant 5‰ des substances suivantes: amidon de blé, maïs, maranta, pomme de terre et riz; amidon soluble, érythrodextrine, maltose et glycogène. Les cinq sortes d'amidons ne sont pas équivalentes: les amidons de blé et de pomme de terre sont les meilleures sortes, toutes les cinq cependant donnent des cultures colorées De tous les produits de dégradation de l'amidon que nous avons étudiés, c'est la dextrine qui donne les cultures les plus rapides et les plus colorées, alors que le maltose reste sans influence.

Nous avions été conduits à examiner le rôle du glycogène par la possibilité de la transformation de l'amidon en glycogène. Le glycogène a en effet été isolé de nombreux organismes inférieurs, notamment de champignons dépourvus de chlorophylle et de bactéries. Le glycogène donne des cultures nettement colorées, mais son action est bien plus faible que celle de la dextrine.

A la suite de ces résultats nous avons bien pu admettre l'attaque de l'amidon jusqu'au stade dextrine, mais rien ne nous prouve la transformation en maltose et en glucose. A ce moment nous avions pensé que notre organisme ne dégrade peut-être pas l'amidon par le stade maltose et glucose α, mais par gentiobiose et glucose β. Le maltose qui résulte de la dégradation normale de la dextrine se compose d'une molécule de glucopyranose α, et d'une molécule de glucopyranose β; c'est un diholoside réducteur. Comme le cellobiose et le lactose ces sucres sont glucosides ou galactosides de la fonction alcool secondaire du glucose. Un autre type de diholosides réducteurs comprend le gentiobiose et le mellibiose qui sont glucosides ou galactosides de la fonction alcool primaire du glucose. Ces faits ont été nettement établis par Irwine et Black (83), Haworth, Loach et Long (84). Nous avons pensé que la nature

de cette liaison glucosidique pouvait influer, par exemple, sur la constitution de la chaîne latérale d'un colorant. Grâce au geste désintéressé de M. le Prof. Hérissey, qui a bien voulu nous envoyer un échantillon de gentiobiose, nous avons pu entreprendre cette étude. Mais encore là le résultat est resté négatif : le gentiobiose est sans influence sur le pouvoir chromogène.

INFLUENCE DU VIEILLISSEMENT DES CULTURES.

Des cultures achromogènes sur milieu synthétique S, abandonnées à la température du laboratoire, après avoir formé une première pellicule strictement incolore, peuvent, si elles possèdent encore une vitalité suffisante, reformer une seconde pellicule nettement colorée. Nous avons souvent remarqué ce phénomène et nous sommes restés longtemps sans pouvoir nous l'expliquer. Dès que nous avions acquis, à la suite de nos recherches sur la violacéine, et son rôle biologique, la certitude qu'il s'agit là d'un pigment respiratoire, c'est-à-dire d'un agent d'oxydation, nous avons pensé que la recoloration de ces cultures vieillies et n'ayant plus à leur disposition qu'un milieu très pauvre, était due à la nécessité où se trouve la bactérie d'oxyder des matières hydrocarbonées complexes. La bactérie ne peut y parvenir que grâce à son pigment et c'est d'ailleurs là la raison d'être du pigment. Ceci nous explique le rôle de l'amidon, oxydé grâce à la violacéine après transformation préalable en dextrine. Le potentiel oxydo-réducteur élevé de ces corps permet d'ailleurs leur attaque plus facile.

Une autre confirmation de cette hypothèse est à chercher, selon nous dans le fait suivant : les principales bactéries chromogènes, que nous avons étudiées dans la partie historique de ce travail sont toutes des bactéries saprophytes et contraintes par le fait même à vivre sur des milieux pauvres, ne contenant pas de substances nutritives facilement assimilables. Elles semblent toutes puiser leur énergie calorifique dans la combustion de matières hydrocarbonées complexes, qu'elles peuvent attaquer, grâce à leur pigment.

Cette hypothèse explique également la disparition progressive du pigment pour les cultures sur milieux synthétiques glucosés. La bactérie n'a plus besoin pour y vivre de son pigment. Elle s'adapte peu à peu à ce nouveau modus vivendi et perd son pouvoir chromogène, désormais superflu.

TROISIEME PARTIE.

Étude de la substance chromogène

Chapitre Premier.

GÉNÉRALITÉS.

Au cours des recherches effectuées pour l'étude des caractères morphologiques et biologiques de notre bactérie, nous avons insisté sur les faits suivants:

Dans toutes les cultures, la substance chromogène reste toujours fixée sur le corps bactérien et ne diffuse jamais dans le milieu de culture. Ce dernier garde toujours sa couleur initiale; seuls les milieux contenant une forte proportion de glycérine se colorent par dissolution du pigment. A l'examen microscopique nous n'avons pas constaté que le pigment siège dans certaines granulations du corps microbien. Reiner-Muller (85) dans l'étude du pouvoir chromogène de Bacterium Coelicolor attache une importance à la présence de corpuscules métachromatiques qu'il a pu mettre en évidence par la coloration de Neisser. Ni par la méthode de Neisser, ni par la technique spéciale de Reiner-Muller (chauffage des frottis à $+120°$ dans une solution de chlorure de sodium et coloration prolongée avec une solution diluée de fuchsine phéniquée ou le colorant de Sienne) nous n'avons pu mettre en évidence l'existence de ces chloroplastes. Nous avons toujours observé une coloration bleu-violacée uniforme de notre bactérie.

La présence de formations cristallines telles que Lasseur les a observées chez Bac. Chlororaphis G. et S., ou que Molisch a décrites pour les bactéries pourprées, n'a pu être constatée dans les cultures au cours de nos travaux.

Selon toutes ces indications nous avons à faire à une substance chromogène insoluble dans l'eau et les milieux de cultures aqueux. Nous en concluons que la bactérie produit elle-même le pigment violet. Il ne résulte donc pas d'une substance incolore produite par la bactérie et éliminée dans le milieu extérieur où elle se combine à certains éléments pour

former un dérivé coloré. Notre bacille, soumis aux variations de température et de pH secrète toujours le même pigment violet. Toutes les bactéries chromogènes ne se comportent pas ainsi. Bac. Prodigiosus demande une température de culture bien déterminée et Bac. Citrullus Sartoryi ne produit sa coloration rose typique que pour des pH initiaux de 4,21 à 6,21.

Comme il nous fallait une production intensive de pigment nous avons effectué nos cultures dans les conditions optima, c'est-à-dire à la température de +27° C. et au pH 6,2. Afin de disposer d'une plus grande surface de culture, nous nous sommes servis de boîtes de Roux en pyrex, contenant environ 150 cm^3 de milieu avec une surface de culture de 200 centimètres carrés environ. Ces boîtes étaient soigneusement bouchées à l'aide d'un tampon de coton bien serré, protégé lui-même par un capuchon double de papier glacé, pour éviter l'évaporation du milieu. Wrede et Hettche, au cours de leurs travaux en vue de l'isolement de la prodigiosine avaient employé de grandes cuves en zinc de faible hauteur, se recouvrant les unes les autres; le tout est placé à l'étuve. Ce procédé certes très ingénieux ne nous a pas paru fournir les conditions d'aseptie et de stérilité voulues pour nos cultures. Il est évident que tous ces essais d'isolement du pigment doivent être tentés sur des cultures pures.

Nous avons employé le milieu de culture suivant, qui nous a donné les meilleurs résultats:

Peptone de viande sèche	5 gr.
Dextrine	5 gr.
Glucose	5 gr.
Glycérine	2 gr.
Phosphate bipotassique	1 gr.
Chlorure de sodium	0,5 gr.
Sulfate de magnésium	0,3 gr.
Sulfate ferreux	trace
Chlorure de calcium	0,3 gr.
Eau dist. q. s. pour	1000 cm^3

Ce milieu, ajusté au pH = 6,2 au moyen d'une solution de KOH, est porté à 120° pendant cinq minutes, puis filtré et réparti dans les boîtes de Roux. Le tout enfin est stérilisé et ensemencé. Les cultures se colorent après quarante huit heures et atteignent leur maximum de coloration après dix à quinze jours de culture. Nous nous sommes cependant servi, en vue de l'extraction du pigment de cultures d'au moins trois semaines.

Chapitre II.

Extraction et purification du pigment.

I. EXTRACTION.

Dans la partie historique, nous avons décrit les méthodes employées jusqu'à présent pour l'extraction du pigment des bacilles violets.

Tous les auteurs emploient soit l'alcool soit l'acétone. Ces corps, tout en étant d'excellents solvants, se mélangent au milieu de culture aqueux. Ceci a un double inconvénient: à côté du pigment on dissout de nombreuses impuretés, d'où la grande difficulté d'obtenir le pigment pur. De plus les évaporations, par suite de la grande quantité de liquide à évaporer sont rendues bien plus longues et plus difficiles. C'est pourquoi nous avons cherché dès le début une nouvelle méthode d'extraction. Wrede et Hettche avaient employé pour l'extraction de la prodigiosine, également insoluble dans l'eau, une méthode spéciale. Ils libèrent la prodigiosine des corps bactériens par destruction de ceux-ci dans des solutions alcalines diluées. La prodigiosine est extraite de ces solutions par l'éther de pétrole. Nous avons essayé d'appliquer ce procédé à l'extraction de la violacéine. Cependant, malgré l'emploi de différentes solutions de potasse, soude et ammoniaque, le pigment n'a pas résisté à l'attaque des solutions alcalines.

Le problème le plus délicat était le choix du solvant. Nous nous sommes adressés avec de bons résultats, à l'éther sulfurique. A cet effet les cultures sont versées dans des flacons en verre résistant, additionnées d'un égal volume d'éther sulfurique. On agite vivement, dans une machine à agiter, à plusieurs reprises pendant quelques jours. Pour faciliter la

désintégration des voiles on ajoute des billes de verre. La couche éthérée se colore rapidement en violet-rouge; cependant la dissolution du pigment est très lente. Après différents essais nous avons additionné nos milieux de culture de sulfate d'ammonium cristallisé jusqu'à une concentration finale de 20%. Ainsi l'extraction est plus rapide et plus complète. La couche éthérée, qui contient maintenant le pigment est décantée et évaporée dans le vide à la température ordinaire. On peut également récupérer l'éther par distillation sans altérer le pigment, on termine l'opération dans le vide. Nous obtenons ainsi une masse violet-noire, de consistance graisseuse. Nous avons fixé à 20% la teneur optima des cultures en sulfate d'ammonium cristallisé. Il est possible qu'à cette concentration, il se forme une émulsion par agitation avec l'éther. Cette émulsion ne nuit en rien à l'extraction du pigment, bien au contraire. Pour la détruire, pour décanter l'éther, on peut se servir d'un dispositif utilisant le vide de la trompe ou centrifuger pendant quelques minutes la couche émulsionnée. Quant à l'action du sulfate d'ammonium, il est à présumer qu'il augmente la perméabilité de la membrane bactérienne par dissolution de certains albuminoïdes.

Pour extraire le pigment de quantités de cultures plus réduites (deux cents centimètres cubes environ) en vue d'un dosage de la matière colorante, on peut très avantageusement remplacer l'éther sulfurique par un mélange à parties égales d'alcool, d'acétone et d'éther sulfurique. Ce procédé a l'avantage d'extraire complètement le pigment après un temps assez court; par contre l'évaporation de cette solution dans le vide est assez laborieuse et serait fort longue pour de grandes quantités de culture. C'est ce qui nous a déterminé à opérer avec l'éther sulfurique seul pour les extractions plus importantes.

II. PURIFICATION.

La masse violet-noir, graisseuse, obtenue précédemment, se dissout sans résidu dans l'alcool et dans l'acétone, ces corps ne pourraient donc servir à une purification. C'est alors que nous avons essayé de séparer les corps gras par saponification, pensant que notre pigment est peut-être lié à ces lipides. Les solutions, même les plus faibles, de soude ou de potasse caustique ont toujours attaqué le pigment. En dernier lieu nous nous sommes adressé à l'ammoniaque en solution aqueuse à 20%. Une demie heure d'ébullition de la solution

alcoolique de notre pigment, additionnée de 5% d'ammoniaque ne modifiait pas sensiblement notre pigment. Après évaporation de l'alcool dans le vide, et lavage du résidu à l'eau distillée, nous avions une poudre violet-noir amorphe. Des essais de cristallisation dans l'alcool absolu, alcool méthylique, dans l'éther sulfurique, malgré des temps d'évaporation allant jusqu'à six jours sont restés sans résultat. Pendant ces opérations nous avons remarqué que notre pigment se dissout légèrement dans l'eau bouillante. La solution prend une couleur bleu-violacé. Par refroidissement d'une goutte de cette solution sur une lame de verre, nous avons pu observer au microscope des cristaux bleu-clair en forme de fuseaux, nettement isolés les uns des autres. Ces cristaux mesurent en moyenne 5 μ de longueur sur 2 μ de largeur,et étaient accompagnés de nombreuses impuretés. Ils n'avaient donc pas d'intérêt pour la purification du pigment à cause de leur taille réduite; d'autre part, nous n'étions plus en présence du pigment à l'état naturel: une modification ayant très bien pu se produire au cours de la saponification. La teinte bleue plus prononcée des solutions alcooliques de ce pigment saponifié semble d'ailleurs confirmer cette manière de voir.

Nous nous sommes alors efforcés de précipiter le pigment des solutions impures dont nous disposions, mais les réactifs les plus variés, employés ordinairement dans la précipitation des matières colorantes, ne nous ont pas donné les résultats voulus. Nous avons alors essayé de précipiter notre pigment en solution dans l'éther anhydre (chlorure de calcium puis sodium) par un courant de gaz chlorhydrique desséché dans une colonne de chlorure de calcium. Cette technique avait été également employée par Wrede et ses collaborateurs pour l'extraction de la prodigiosine et par E. Friedheim pour le pigment de son bacille violet. Nous avons obtenu un précipité bleu amorphe de chlorhydrate de violacéine. Ce dernier est très instable et se dissocie immédiatement dans l'eau en donnant une solution verte de laquelle on ne peut plus régénérer le pigment violet. Friedheim avait également obtenu des chloroaurates et chloroplatinates, amorphes. L'acide perchlorique n'a pas donné de meilleurs résultats.

Il ne nous était donc pas possible de précipiter convenablement notre pigment pour le séparer des impuretés. Nous avons alors essayé de séparer les impuretés pour ne laisser que le pigment pur cristallisable. La masse violet-noir graisseuse a été dégraissée par agitation à froid et à plusieurs

reprises avec de l'éther de pétrole. Après décantation et évaporation de l'éther de pétrole il nous restait un corps gras transparent, de couleur jaune-clair, que nous analyserons plus loin. Dans notre ballon restait une poudre noire amorphe à reflets violacés. Une deuxième purification par agitation avec le chloroforme à froid ne laissait pas de résidu sensible. Un dernier traitement à l'eau distillée tiède enleva le sulfate d'ammonium et les autres sels, qui auraient pu passer dans l'éther. Nous avions alors une poudre brillante, écailleuse, violet-noir, rappelant par son aspect le bleu de méthylène. Le pigment ne nous paraissait pas encore assez pur, surtout pour les analyses spectroscopiques. C'est pourquoi nous avons pensé à éliminer les dernières traces de corps gras par une extraction de vingt quatre heures à l'éther de pétrole dans l'appareil de Kumagawa-Suto. Comme la quantité de pigment à purifier est toujours faible, il est utile de l'envelopper soigneusement dans du papier filtre, dégraissé au préalable, et de placer le tout dans la cartouche de l'appareil.

Le pigment ainsi purifié, a été soumis à de nombreux essais de cristallisations dans les différents solvants de la violacéine. L'alcool, même absolu, ne nous a jamais donné de résultats positifs. Il en est de même pour l'éther sulfurique et l'alcool méthylique. *Seules les solutions acétoniques, soumises à une évaporation lente dans un dessiccateur à la glacière, nous ont donné de superbes cristaux noir-violacé; ces cristaux se présentent rarement seuls, mais groupés en rosaces et en oursins.* Ils mesurent jusqu'à un millimètre de diamètre. L'examen de ces cristaux au microscope, l'analyse capillaire selon la méthode de Goppelsroeder, et l'analyse spectrale, nous ont montré que nous avions bien à faire à notre pigment, pur. L'emploi de l'acétone pour laisser cristalliser des pigments n'est pas une nouveauté, puisque Lasseur l'avait déjà préconisé pour la cristallisation de la chlororaphine.

Notre méthode d'obtention de la violacéine se résume donc de la manière suivante:

A) *Extraction de la violacéine.*

1) Agiter les cultures aqueuses, additionnées de 20% de sulfate d'ammonium cristallisé avec un égal volume d'éther sulfurique.

2) Décanter la couche éthérée et évaporer dans le vide, ou distiller la solution éthérée à +40° C. et récupérer l'éther.

B) *Purification de la violacéine.*

1) Laver le résidu violet graisseux des opérations précédentes, successivement avec:

éther de pétrole,
chloroforme,
eau distillée.

2) Purifier la poudre violette, pendant 24 heures à l'éther de pétrole dans l'appareil de Kumagawa-Suto.

3) Dissoudre le pigment pur dans aussi peu d'acétone que possible et laisser cristalliser lentement.

A l'aide de cette méthode, légèrement modifiée, ainsi que nous l'avons exposé précédemment, pour opérer sur de petites quantités de cultures, nous avons pu extraire 18 milligrammes de violacéine pure pour 50 centimètres cubes de culture, ce qui représente à peu près 7% du poids des corps bactériens.

ANALYSE DES LIPIDES D'EXTRACTION.

Au cours de la purification de notre pigment, nous avons séparé une quantité notable de lipides. Ceux-ci se trouvent surtout dans l'éther de pétrole, employé au cours de la purification. Par évaporation de celui-ci on obtient un résidu jaune-clair, transparent. La nature de ces lipides nous a semblé intéressante, parce que notre pigment paraît dissous dans le corps microbien à la faveur de ces derniers. D'autre part ils ne se colorent pas par le triple colorant de Guéguen.

Les réactions de Salkowski et de Liebermann pour l'identification de la cholestérine sont restées négatives. Dès lors nous avons pensé à la lécithine. Le rapport azote/phosphore nous a donné les résultats suivants:

Pour 1 gr. de lipide: $N = 0{,}029$; $P = 0{,}0643$.

ce qui fait: $$\frac{N}{P} = \frac{0{,}029 \times 31}{0{,}0643 \times 14} = \frac{899}{900} = 1.$$

Nous sommes donc en droit de conclure que notre corps gras rentre dans le groupe des phosphoaminolipides et se range parmi les monophosphomonoaminolipides. Le type de ces derniers est la lécithine.

Pour caractériser plus amplement notre lipide, nous avons déterminé son indice de saponification, qui est de 243, chiffre assez voisin de celui de la lécithine. Cette dernière contient la base choline, grâce à laquelle on peut l'identifier. La choline, obtenue après hydrolyse de la lécithine forme en présence d'iode de magnifiques cristaux de périodure de choline, appelés cristaux de Florence. Nous n'avons jamais pu observer de tels cristaux; notre lipide ne contient donc pas de lécithine. Il se dissout lentement dans l'alcool, alors que la céphéline, autre phosphoaminolipide contenant la base cholamine, y est insoluble. Cependant la céphéline impure se dissout également par agitation prolongée dans l'alcool. Il se pourrait donc que notre lipide soit de la céphéline impure ou alors un phosphoaminolipide voisin.

Chapitre III.

Propriétés physiques et chimiques de la violacéine.

I. PROPRIÉTÉS PHYSIQUES.

La violacéine se présente sous forme d'une poudre microcristalline violet-noir, à reflets brillants, rappelant le bleu de méthylène. A l'examen microscopique on aperçoit de beaux cristaux en forme de rosaces et d'oursins, de couleur violet-rose.

Nous n'avons pas pu déterminer le point de fusion très élevé, car des cristaux chauffés sur une spatule de fer ne fondent pas dans la flamme du bec Bunsen.

La violacéine se dissout *en bleu* dans tous les alcools même la glycérine, et ceci d'autant plus facilement que leur poids moléculaire est plus faible.

en violet dans l'éther sulfurique qui en dissout davantage que l'alcool éthylique.

en violet-rouge dans l'acétone qui est son meilleur solvant.

Elle se dissout également un peu dans l'eau bouillante, en bleu dans la pyridine et en vert dans l'aniline. Ces deux derniers solvants cependant décomposent peu à peu la violacéine. Parmi les acides, seul l'acide sulfurique la dissout en jaune-orange. Il est cependant impossible de régénérer la violacéine à partir de cette solution.

La violacéine est insoluble dans les autres solvants, notamment: dans l'eau froide et l'acide acétique, dans l'éther de pétrole, la benzine, le sulfure de carbone, le chloroforme.

Son pouvoir tinctorial est assez faible: elle teint cependant le coton et le coton préparé au tanin.

II. PROPRIÉTÉS CHIMIQUES.

ACTION DES ACIDES.

L'acide sulfurique concentré seul dissout la violacéine en une liqueur jaune-orangée. L'acide chlorhydrique, l'acide azotique et l'acide acétique ne paraissent pas dissoudre cette substance. Lasseur (86) a pu précipiter à partir de la solution sulfurique, en l'additionnant d'eau goutte à goutte et en refroidissant, des flocons verts, passant au jaune-clair très rapidement. Sous l'influence de lavages, la matière colorante bleuit et il obtenait finalement une substance se dissolvant en bleu dans l'alcool. Malgré de multiples précautions et un refroidissement énergique, nous n'avons pu réussir à reproduire cette expérience.

En solution alcoolique bleue, l'addition de tous les acides précédents fait passer la coloration au bleu intense, puis au vert et au vert-jaune. Ces stades sont réversibles par dilution ou neutralisation. Nous n'avons jamais observé une teinte rose, telle que Lasseur la décrit. L'acide acétique seul ne produit pas la coloration verte.

Nous avons déjà vu précédemment qu'il est possible d'obtenir un chlorhydrate amorphe par un courant de gaz chlorhydrique sec barbotant dans une solution de violacéine dans l'éther anhydre. Ce chlorhydrate est instable et par addition d'eau il régénère le pigment vert par l'acide chlorhydrique. Par lavages à l'eau distillée, cette poudre verte passe au bleu.

ACTION DES BASES.

La soude et la potasse caustiques se comportent de la même manière. Les solutions alcooliques passent d'abord au bleu, puis très rapidement au vert. Cette coloration n'est que passagère et après trois à quatre minutes la solution est devenue brune. Il n'est pas possible de régénérer la solution bleue primitive à partir de la solution verte par les alcalis, alors que la solution verte par les acides reste réversible.

L'ammoniaque, bien moins dissociée que les bases précédentes, s'arrête au stade bleu intense. A froid les solutions se décolorent peu à peu et proportionnellement à la quantité d'ammoniaque. Il n'est pas possible de régénérer par neutralisation la couleur bleue. Si on porte à l'ébullition les solutions ammoniacales encore bleues, elles ne se décolorent plus. La matière colorante semble donc modifiée. C'est à partir de ces solutions, que nous avons pu obtenir, par évaporation de solutions aqueuses bouillantes, des cristaux en forme de fuseaux. Il s'agit sans doute d'un dérivé ammoniacal de notre pigment.

Ces caractères rapprochent considérablement notre pigment de celui de Lasseur. A notre avis il semble bien qu'il s'agisse de la même substance encore impure. Le pigment violet étudié par Hartley est différent du nôtre. Sa solubilité dans le chloroforme et la couleur violette de sa solution alcoolique ainsi que la décoloration presqu'immédiate produite par l'ammoniaque le distinguent nettement. Nous verrons ultérieurement que ces différences se retrouvent dans les spectres d'absorption.

ACTION DES OXYDANTS.

Le permanganate de potassium à 1%, le mélange sulfochromique détruisent immédiatement notre pigment. Il en est de même pour l'eau oxygénée chaude, qui décolore notre solution alcoolique bleue. Les réducteurs ne régénèrent jamais le pigment oxydé.

ACTION DES REDUCTEURS.

L'hydrogène naissant, fourni par le zinc et l'acide chlorhydrique, décolore les solutions alcooliques. L'hydrosulfite de soude à 0,1% produit le même résultat. Nous n'avons pas réussi à régénérer le pigment par l'action d'oxydants.

Avant nous, Friedheim, avait obtenu des résultats identiques et n'avait pas pu obtenir un leuco-dérivé susceptible de régénérer le pigment initial. Cependant, comme il voulait prouver que la violacéine était un pigment respiratoire ce que ses expériences sur le coefficient respiratoire de races achromogènes, auxquelles il ajoutait des solutions de violacéine, semblait prouver, il ajouta la note suivante: «on doit considérer la possibilité que la réduction du pigment in

vitro, étant trop énergique, va trop loin, jusqu'à un stade irréversible, tandis que la réduction par les bactéries vivantes s'arrête à un stade réversible intermédiaire.»

Aidés par cette remarque, nous avons cherché à trouver un réducteur suffisamment doux, qui pourrait s'arrêter à ce stade intermédiaire réversible. Après de nombreux tâtonnements, nous nous sommes adressé au sulfhydrate d'ammonium, tel qu'on le prépare dans les laboratoires et dilué au quart. L'addition goutte à goutte à une solution alcoolique bleue produit une décoloration et la teinte bleue fait place à une teinte jaune-rose. La réoxydation ultérieure par de l'eau oxygénée à dix volumes produit une recoloration totale. Cette expérience peut être répétée un grand nombre de fois sur la même solution de violacéine. Nous avons donc pu obtenir, grâce au sulfhydrate d'ammonium, un leuco-dérivé rose réversible par addition d'eau oxygénée. Ceci confirme donc l'hypothèse émise par Friedheim en 1932.

Chapitre IV.

Analyse de la violacéine.

POIDS MOLÉCULAIRE.

Après toutes les recherches que nous venons de décrire, nous disposons encore d'environ 200 à 300 milligrammes de violacéine.

Nous n'avons pu entreprendre une détermination du poids moléculaire à cause de l'insolubilité de la violacéine dans les solvants couramment employés. La solubilité dans l'alcool, assez faible d'ailleurs, nécessiterait l'emploi de techniques spéciales pour une détermination rigoureuse de l'abaissement cryoscopique.

Une approximation cependant de la grandeur du poids moléculaire devait nous être donnée par l'analyse spectrale. M. le Professeur Vlès trouva approximativement 180.

ANALYSE ÉLÉMENTAIRE.

La présence du carbone est démontrée par la combustion de la violacéine et par le résidu carbonisé qu'elle laisse. Ceci a été constaté notamment au cours des expériences de combustion et de recherche de l'azote.

La présence de l'azote en quantité notable est démontrée par la formation de ferricyanure ferrique. La violacéine chauffée dans un creuset en présence de sodium, carbonise énergiquement. Le charbon repris par de l'eau distillée donne une solution renfermant du cyanure en abondance, comme le démontre la réaction du bleu de Prusse.

La recherche du soufre est restée négative.

L'analyse élémentaire quantitative a donné les résultats suivants:

1,455 mgr. donnent 10,205 mg. CO^2 et 2,280 mg. H^2O.

1,000 mgr. donnent 0,2670 cm^3 d'N sous 705 mm de mercure et 30° C.

Il en découle que notre substance renferme:

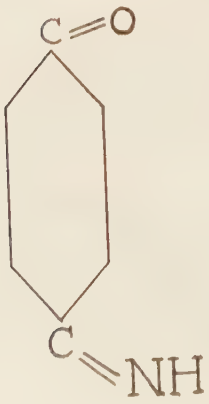
62,48% C.
5,72% H.
6,97% N.
24,83% O.

La combustion de la violacéine laisse une légère trace de cendres, impureté (Na ou K) provenant du traitement du pigment par des solvants et réactifs contenant des traces d'impuretés. Si nous établissons maintenant la formule chimique globale, nous trouvons:

Composition centésim.		Division par P. M.	Donne	Rapporté à l'unité x 2:
C = 62,5	:	12 = 5		2×5 = 10
H = 5,75	:	1 = 6		2×6 = 12
N = 6,97	:	14 = 0,5		2×0,5 = 1
O = 24,83	:	16 = 1,5		2×1,5 = 3

C'est à dire: $C^{10}H^{12}NO^3$

La violacéine ne renferme donc qu'un seul atome d'azote. En essayant de construire un noyau chromophore avec la formule $C^{10}H^{12}NO^3$, nous obtenons une quinone-imine de Willstætter:



Il resterait encore une chaine latérale soit droite soit cyclique avec:

$C^1H^7O^2$.

Ces résultats distinguent notre pigment de celui isolé par Tobie de Bacillus Violaceus II (86). Ce dernier se classerait, en effet, d'après cet auteur, dans les pyrrols et serait par conséquent voisin de la prodigiosine.

ANALYSE SPECTRALE.

Les propriétés physiques et chimiques, les résultats de l'analyse élémentaire ne nous permettent pas d'identifier complètement la violacéine ou de la classer définitivement dans un groupe de colorants. Nous avons entrepris l'étude spectroscopique de la violacéine dans le but d'éclaircir davantage sa composition chimique et de comparer les résultats obtenus avec les spectres de pigments violets déjà étudiés.

Toute cette analyse spectrale a été effectuée à l'Institut de Physique Biologique de la Faculté de Médecine de Strasbourg, sous la direction de M. le Professeur Vlès. Les spectres d'absorption dans le visible et les plaques spectrophotométriques ont été lues par M. le Professeur Vlès.

I. ABSORPTION DANS LE VISIBLE.

Les solutions dans l'alcool à 95°, renfermant 0,0026 gr. % de violacéine, présentent deux bandes d'absorption. Ces deux bandes correspondent aux maxima de Formaneck-Grandmougin suivants:

1re Bande: λ=582 bande forte
2e Bande: λ=620 bande faible.
Un contrefort à λ=546.

L'addition d'acide sulfurique pur concentré (0,7 cm³ pour 10 cm³ de solution) fait virer la couleur au vert. Le spectre d'absorption est déplacé et on note les maxima de Formaneck et Grandmougin suivants:

1re Bande: λ=641 bande faible.
2e Bande: λ=695 bande forte.

Une troisième bande semble située vers: λ=610-585, mais en réalité ce n'est que le reste de l'ancienne bande: λ=621-582, venant d'une partie de la violacéine non transformée par l'acide sulfurique.

Lasseur, dans son étude de la violacéine, trouve ces mêmes bandes; nous les avons décrites dans la partie historique. Il semble donc que le pigment étudié par cet auteur soit identique à la violacéine que nous avons isolée.

Hartley, par contre, a dû examiner un pigment violet différent du nôtre, car il note qu'une seule bande d'absorption s'étendant de λ=6100 à λ=4900 environ.

II. ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET.

Les solutions de violacéine sont toujours faites dans l'alcool à 95°. La solution mère était une solution saturée contenant 0,077 gr. % de violacéine. Tous les examens spectrophotométriques ont été effectués sous une épaisseur d'un centimètre et à la température du laboratoire (+22° C.) sur des dilutions successives dans l'alcool à 95° à 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, et 1/32, selon la technique de M. Vlès (87). Nous obtenons un spectre d'absorption caractéristique avec deux bandes correspondant à:

1re Bande: λ=260 bande forte.
2e Bande: λ=374 bande faible.
Un contrefort sur λ=295.

L'addition d'acide sulfurique pur concentré à 66° B. vire la solution au bleu puis au vert. Les examens ont été effectués 15 minutes après l'addition d'acide. Les quantités d'acide ajoutées à 5 cm³ de solution variaient avec la dilution et la teinte à observer:

dilution 1/8	plus 0,1 cm³	de SO^4H^2	= sol. bleue.
dilution 1/8	plus 0,3 cm³	—	= sol. bleu-verte.
dilution 1/32	plus 0,3 cm³	—	= sol. vert-bleue
dilution 1/8	plus 0,9 cm³		sol. verte.
dilution 1/16	plus 0,9 cm³	—	= sol. verte.
dilution 1/32	plus 0,9 cm³	—	= sol. verte.

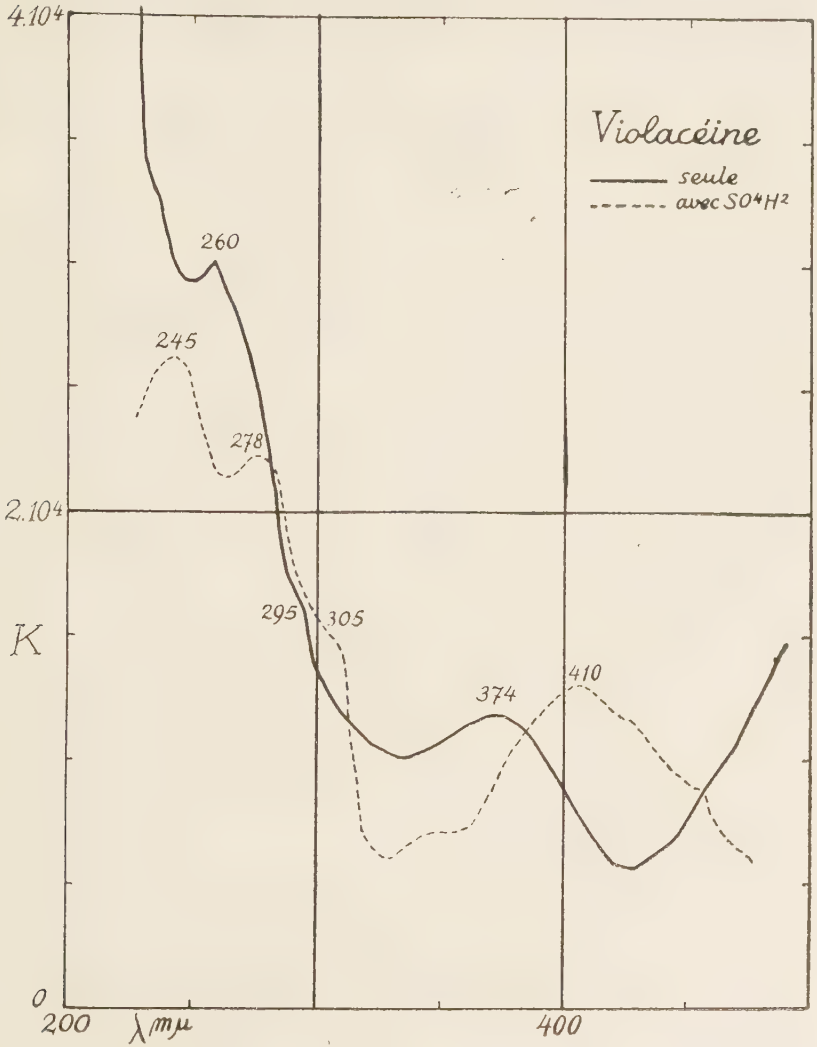
Dans ces conditions nous avons observé les trois bandes suivantes:

1re Bande: λ=245.
2e Bande: λ=278.
3e Bande: λ=410.

Des contreforts à λ=305; et 345 (probablement un reste de la bande 374 de la forme violette.)

Ces observations ne correspondent pas à celles de Lasseur. Pour la violacéine seule, il observe une bande parasite s'étendant de λ 284 à λ 276. Sa deuxième bande de λ 270 à λ 262, correspond à notre première bande. Tandis que notre seconde bande λ 374, ne pouvait être perçue par Lasseur, puisque dans ses observations la fin du spectre du fer s'arrête à λ=258.

La courbe spectrophotométrique des deux formes du pigment est donnée dans le graphique ci-contre.



ABSORPTION DE LA VIOLACEINE
DANS L'ULTRA-VIOLET.

K en gr. / cm. / cm³. λ en mμ.

En se guidant sur la constitution de l'oxychlororaphine, la comparaison par M. le Professeur Vlès, de ces spectres avec celui de la phénazine laisserait homologuer la bande λ=371

de la violacéine avec la bande λ=361 de la phénazine. D'autre part une comparaison avec une lactoflavine (bande λ=350; 260) montre une grande analogie. Cependant le fait que la violacéine ne renferme qu'un atome d'azote, écarte ces rapprochements.

Conclusions générales.

De l'ensemble de nos recherches (87), il découle que le germe isolé d'un pus dentaire par M. J. Meyer, est un organisme bactérien nouveau à propriété chromogène.

Bacillus Violaceus Sartoryi présente les caractéristiques suivantes: bâtonnets droits, à extrémités arrondies, mesurant en moyenne 3μ7 de longueur sur 0μ6 de largeur. Les éléments du voile sont nettement plus petits. Le bacille se présente alors sous forme de bâtonnets très courts, coccobacillaires mesurant 1μ5 sur 1μ25. Ces formes coccobacillaires seules sont mobiles et pourvues d'un grand cil terminal.

Notre bacille produit des spores, incluses dans le corps bactérien. Il se colore facilement par les colorants d'aniline, mais ne reste pas coloré par la méthode de Gram.

Ce bacille présente les propriétés biologiques suivantes: c'est un aérobie strict. Son optimum cultural est de +27° C., sur milieu ajusté au pH optimum 6,2. La production de pigment n'est pas en relation avec la température de culture, ni avec le pH. La lumière reste sans influence sur la vitalité et la chromogénèse de Bacillus Violaceus Sartoryi. Par contre cet organisme est assez sensible à la chaleur: un séjour de cinq minutes à +60° C. suffit à le tuer. Le bacille violet pathogène de Gaducheau se comporte à peu près de même. Notre germe est doué d'une grande vitalité, mais semble dépourvu de pouvoir pathogène.

Bacillus Violaceus Sartoryi tire un meilleur parti des substances quaternaires organiques que des sels ammoniacaux. En l'absence d'hydrates de carbone ou d'alcools polyatomiques, telle la glycérine, le bacille ne se développe pas, de même sur des milieux ne contenant que des matières quaternaires. L'assimilation de ces dernières nécessite la

présence d'un aliment ternaire. Le fer ou le magnésium sont nécessaires à la chromogénèse. Mais Bacillus Violaceus Sartoryi est avant tout un saprophyte et par là, il se rapproche bien des autres bactéries violettes. Sa chromogénèse nécessite un milieu pauvre en matières ternaires facilement assimilables et contenant plutôt des matières nutritives à grosse molécule, telle la dextrine. Le potentiel oxydo-réducteur de cette dernière explique aussi son rôle important dans la régénération du pouvoir chromogène.

Les caractères culturaux de notre bacille le rapprochent fortement de Bac. Violaceus Macé. Les milieux courants: bouillon simple, solution de peptone, bouillons sucrés, milieu de Sabouraud, conviennent bien. Cependant après de nombreux repiquages, on obtient des races achromogènes, moins vivaces.

Le pouvoir chromogène peut être régénéré par repiquage sur pomme de terre glycérinée ou sur milieux amidonnés ou dextrinés. Les cultures sur milieux peptonés dégagent souvent une odeur caractéristique rappelant celle des fraises.

Les propriétés biochimiques sont les suivantes: notre bacille possède un grand pouvoir protéolytique vis-à-vis de la gélatine, du sérum coagulé et du blanc d'œuf. Il attaque tous les sucres sans dégagement de gaz. Il coagule le lait avec dissolution partielle de la caséine. Il ne réduit pas les nitrates, mais le rouge neutre. Il produit une notable quantité d'indol, mais pas d'H^2S.

Par tous ces caractères notamment par son aspect morphologique, par la nature et la variabilité du pouvoir chromogène, l'action de l'amidon, la coloration Gram négative, notre bacille se rapproche bien des bacilles violets et surtout de Bacillus Violaceus Macé. Cependant, à côté de notables différences morphologiques, telles les formes coccobacillaires, de l'odeur de fraise de nos cultures, la production d'indol distingue nettement notre germe de celui étudié par Macé. Un autre bacille violet ressemble morphologiquement à notre microorganisme, c'est celui que décrit Gaducheau, cependant notre organisme semble dépourvu de pouvoir pathogène, tout au moins vis-à-vis du cobaye.

L'énumération des bacilles violets connus jusqu'à présent, l'étude de leurs propriétés morphologiques, biologiques, culturales et biochimiques, telle que nous l'avons faite dans

la partie historique, permet de se rendre compte qu'il s'agit ici d'une espèce chromogène nouvelle.

Bacillus Violaceus Sartoryi secrète un pigment, la Violacéine. Ce dernier a pu être isolé à l'état cristallisé par extraction à l'éther sulfurique, purification dans l'éther de pétrole, le chloroforme et l'eau distillée; la cristallisation a été faite dans l'acétone.

La violacéine se présente en fines aiguilles, toujours groupées en oursins et en faisceaux. Les propriétés chimiques de ce pigment ne sont pas caractéristiques d'un groupe de colorants déterminés. Il faut cependant noter l'obtention d'un leuco-dérivé rose par réduction à l'aide du sulfhydrate d'ammonium, réoxydable par l'eau oxygénée.

L'analyse élémentaire quantitative nous a permis d'établir la formule globale:

$$C^{10}H^{12}NO^{3}$$

L'analyse spectrale montre que notre pigment est identique à celui étudié par Lasseur. Dans le visible nous obtenons les bandes suivantes:

1re Bande: λ=582.
2e Bande: λ=620.
Un contrefort sur λ=546.

et dans l'ultra-violet:

1re Bande: λ=260.
2e Bande: λ=374.
Un contrefort sur λ=295.

Ces résultats ont permis à M. le Professeur Vlès d'évaluer le poids moléculaire à environ 180, ce qui correspond à notre formule.

Quant au rôle de ce pigment, nous nous rallions à l'opinion de A. Friedheim. Après ses travaux sur l'accroissement considérable du coefficient respiratoire de races achromogènes de bacilles violets dépourvus de substances nutritives exogènes après addition de violacéine en solution glycérinée, cet auteur considère cette dernière comme *pigment respiratoire*. Cette opinion se trouve encore renforcée par la possibilité d'obtenir maintenant un leuco-dérivé réversible.

Chimiquement nous aurions par conséquent, un système respiratoire répondant à la formule:

$$O = C^6H^4 = NH \quad \text{forme violette}$$

$$\text{oxydation} \quad \uparrow\downarrow \quad \text{réduction}$$

$$OH - C^6H^5 - NH^2 \quad \text{leuco-dérivé incolore.}$$

Nous partageons également l'opinion de A. Friedheim sur la nature des corps sur lesquels s'exercerait cette oxydation. Cet auteur admet que ce serait sur les lipides, contenus dans le bacille et que nous savons être un monophosphomonoaminolipide; considérant aussi l'importance de l'amidon et surtout de la dextrine dans le métabolisme de notre bactérie, il nous semble que la violacéine serve également à l'oxydation de ces derniers.

Le processus de synthèse employé par la bactérie pour former son pigment reste obscur. Nous n'avons pu le préciser. Ceci nécessiterait avant tout la détermination exacte de la nature chimique de la violacéine et sa synthèse in vitro. Cependant le potentiel oxydo-réducteur élevé de l'amidon et surtout de la dextrine pourrait intervenir dans la formation de la violacéine en favorisant la cyclisation du noyau quinone-imine. Cette hypothèse tient parfaitement compte de la nécessité de l'amidon dans la régénération du pouvoir chromogène.

Notes bibliographiques.

38. — ARTAULT S. Recherches bactériologiques, mycologiques, zoologiques et médicales sur l'œuf de poule et ses agents d'infection. Paris, Ollier Henry, p. 328, 1893.

10. — BEIJERINCK. Botan. Zeitung 1891, S. 726.

62. — — — — 1891, S. 705. Die Lebensgeschichte einer Pigmentbacterie.

1. — BIZIO Bartolomeo: voir P. Spica Sulla materia colorante prodotta dal Micrococcus Prodigiosus di P. Spica. M. E. Atti del rale Instituto Veneto di Scienzes, Letture ed Arti. Ser. 8. T. 2. 1899/1900 Disp. 10.

75. — BŒHM et KOPACZEWSKI: cft. Lasseur: Travaux de Microbiologie, Nancy 1931, p. 28.

29. — BOLAND G.-W. — Ueber Pyocyanin, der blaue Farbstoff des Bacillus Pyocyaneus. Centralblatt f. Bakt. Orig. B. XXV, S. 897, 1899.

47. — BREAUDAT. Sur un nouveau microbe producteur d'acétone. Ann. Inst. Past., t. 20, p. 894, 1906.

39. — BREVILLE R. Les eaux potables. Procédés actuels d'appréciation de leur valeur hygiénique. Baillière, p. 100, 1897.

41. — BUJWID O. Die Bakterien in Hagelkörnern. Orig. cft. Central. f. Bakteriol., III. Bd., S. 1, 1888.

52. — BUJWID O. Sur les Bactéries trouvées dans la grêle. Ann. Inst. Past., t. I, p. 592, 1887.

70. — BUSCHKE et HARRY. Beitrag zur Sporulationsfähigkeit parasitischer u. pathogener Hefe. Derm. Woche 1923.

48. — CHOLKEWITSCH. Bacter. Crist. Violaceum sp. nov. Cholkewitsch, cft. Godfrin: Thèse Pharm. Nancy, 1934, p. 93.

31. — CLUZET J. et ROCHAIX A. Contribution à l'étude spectrographique des pigments du bacille pyocyanique. Journ. de Phys. et de Pathol. génér. Paris, t. 29, p. 378. 1921.

74. — CLUZET, ROCHAIX, KOFMAN: cft. Lasseur: Travaux de Microbiol. Nancy 1931, p. 28.

7. — DHERE. Etude fluoroscopique de la chlorographine et de ses dérivés. C. R. Soc. de Biol. T. CXV 1934, p. 1461.

55. — EISENBERG J. Balteropmpgoscje Doagnotik: Hilfstabellen zum Gebrauche beim praktischen Arbeiten. 1891. 3. Auflage. Hamburg u. Leipzig, L. Voss.

6. — ELEMA. Oxidation-reduction potentials of chlororaphine. Recueil Trav. Chim. d. Pays-Bas, T. 52, N° 7/8 1933, p. 569.

13. ERDMANN. Journ. für praktische Chemie. Leipzig 1866, p. 385.
51. FLUGGE C. Les Microorganismes. Trad. Henrijean. A. Manceaux. Bac. Janthinus 1887, p. 255.
2. FORDOS: Recherches sur la matière colorante des suppurations bleues: pyocyanine. C. R. Ac. Sciences 51, p. 215, 1869.
36. FRANKLAND Percy et FRANKLAND M. R. S. Percy. Microorganisms in Water. London, Longmans, Green and C°, 552 p., 1894.
60. FRIEDHEIM E. La fonction respiratoire du pigment du «Bac. Violaceus» C. R. Soc. Biol., t. CX 1932, p. 353.
63. GAUDUCHEAU: Sur un bacille violet pathogène C. R. Soc. Biol., t. I, p. 278. 1907.
56. GERMANO Ed. Der Membranaceus Mobilis Amethystinus. C. F. Bakt. 1892. Bd. XII, S. 516.
27. GESSARD C. De la pyocyanine et de son microbe. Thèse Méd. Paris, 1882.
id. GESSARD C. Des races du bac. Pyocyanique. Ann. Inst. Past. 5, p. 70, 1891, et 4, 2, 1890.
12. GODFRIN. Contribution à l'étude des bact. bleues et violettes. Thèse Pharm. Nancy 1934.
59. GOPPELSRŒDER. Kapillaranalyse u. das Emporsteigen der Farbstoffe in den Pflanzen. Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft. Basel 1901, Bd. 14.
15. GRIFFITHS. C. R. Acad. d. Sciences Juillet et Décembre 1892, p. 321.
57. HARTLEY. Etude d'un pigment violet., cft. Godfrin Th. Pharm. Nancy, 1934.
84. HAWORTH, LOACH et LONG. The Constitution of the Disaccharides. Part. XVII Maltose and Melibiose. Journ. Chem. Soc. 1927, 3146.
68. HEIM L. Lehrbuch der Bakteriologie, p. 176.
53. HUEPPE F. Untersuchungen über die Zersetzung der Milch durch Mikroorganismen. Mitteil. aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte. II. Bd., S. 308, 1884.
40. IMBEAUX Ed. Les eaux potables et leur rôle hygiénique dans le département de Meurthe-et-Moselle. Th. Méd. Nancy 1897.
83. IRWINE et BLACK. The Constitution of Polysaccharides Part. VII, Essarto Cellulose. Journ. Chem. Soc. 1924, 125, 15.
42. JORDAN. Stade Board of Health, Massachussets, Purification of sewage Wasser. 1890, p. 838.
5. KÖGL, TÖNNIS et GRŒNEWEGEN. «Ueber Chlororaphin u. Xanthoraphin», ein Beitrag zur Chemie der Chinhydrone. Annal. der Chemie, Bd. 497, H. 3, S. 265. 1932.
33. KÖGL et POSTOWSKY. Ueber das grüne Stoffwechselprodukt des Bac. Chlororaphis. Annal. der Chemie, Bd. 480 H. 2 & 3, 1930, S. 280.
77. KOPACZEWSKI. Cft. Lasseur, Travaux de Microbiologie, Nancy, 1931, p. 28.
20. KRAFT. Beiträge zur Biologie des Bact. Prodigiosum u. zum Chem. Verhalten seines Pigmentes. Diss. Würzburg, 1902.
1. LASSEUR Ph. Contribution à l'étude de B. Chlororaphis G. et S. Thèse Sciences Nancy, 1911.

21 et 86. — LASSEUR et GIRARDET. Contribution à l'étude des pigments bactériens. Nancy 1927, p. 55.

32. — LASSEUR Ph. Travaux du Laborat. de Microbiologie Nancy, 1934, p. 21.

58. LASSEUR Ph. Travaux du Laborat. de Microbiologie Nancy. 1934.

73. — LASSEUR et DUPAIX. Travaux du Laborat. de Microbiologie Nancy, 1930, p. 27.

76. — LASSEUR Ph. Relations entre pH, végétation et chromogénèse. Travaux du Laborat. de Microbiologie Nancy, 1931, p. 28.

80. — LASSEUR, THIRY, DUPAIX et OLIVIER. Influence du phosphore et du Magnésium sur la fonction fluorescigène de B. Caryocyaneus. Travaux du Laborat. de Microbiologie Nancy, 1930, p. 33.

81. — LASSEUR, COMBE et DUPAIX. Influence du fer dans la production de la prodigiosine. Travaux du Laborat. de Microbiologie Nancy, 1931, p. 45.

61. — LECOQ DE BOISBAUDRAN. Cft. Spectre du pigment violet. Godfrin. Thèse Pharm. Nancy, 1934, p. 182.

30. LEDDERHOSE. Deutsche Zeitschrift für Hygiene, 1888.

45. LUSTIG A. Diagnostik der Bakterien des Wassers, 2. Auflage. Uebersetzt v. R. Teuscher, 1893, Iéna, Fischer, S. 128.

34. — MACE E. Traité pratique de Bactériologie 1913, II[e] partie, p. 412.

26. MAMELLE. Contribution à l'étude du B. Pyocyaneus Erythrogènes Gessard. Thèse Pharm. Nancy, 1919.

43. — MARSCHALL WARD. A violet Bacille of the Thames. Ann. of. Bot. 1898, p. 29.

24 et 37. — MIGULA. System der Bakterien. Fischer G. I. Bd. 1897, S. 368; II. Bd. 1900, S. 1068.

66. — NEPVEUX. Le bacillus Bruntzii, Paris, Jouve et Cie, 1920, p. 21.

54. PLAGGE et PROSKAUER. Bericht über die Untersuchungen des Berliner Leitungswassers in der Zeit vom 1. 7. 1885 bis Ende April 1886. Zeitschrift f. Hygiene, 1887, II. Bd. S. 401.

25. — RADAIS. Sur une nouvelle race du bacille pyocyanique. C. R. Soc. Biol., t. 49, p. 808, 1897.

79. — RAULIN. Etude chimique sur la végétation. Thèse Sciences physiques, Paris. Masson, 1870, p. 216.

82. — REICH W. S. et DAMANSKY A. F. Nature de l'amidon. Bulletin de la Soc. de Chimie Biologique, t. XIX, N° 1, p. 159.

85. — REINER-MULLER. Eine Diphteridie u. eine Streptothrix mit gleichem blauen Farbstoff. Central. f. Bakt. Orig. I, 1908. 46, S. 209.

65. — RIVALIER et SEYDEL. Nouveau procédé de culture sur lames gélosées. Ann. de Parasitologie 1932.

19. — ROSENBERG. Beiträge zur Kenntnis der Bakterienfarbstoffe. Thèse Méd. Würzburg 1902.

67. — SARTORY A. Guide pratique des Manipulations bactériologiques, p. 113.

72. — SARTORY A. Guide pratique des Manipulations de Mycologie parasitaire, p. 101.

87. A. SARTORY, J. MEYER et J. WÆLDELÉ. Contribution à l'étude d'une Violacéine obtenue à l'état cristallisé et provenant d'un bacille violet isolé du pus d'un abcès dentaire. C. R. Ac. Scienc. 1938. Vol. 12, p. 950.

16. SCHEURLEN. Geschichtliche u. Experimentelle Studien über den Prodigiosus, Leipzig. Arch. f. Hygiene 1896, Bd. 26, S. 1.

18. SCHNEIDER. Die Bedeutung der Bakterienfarbstoffe für die Untersuchung der Arten. Arb. aus dem Bakter. Inst. Karlsruhe, Bd. I, 1897, S. 203.

17. — SCHOTTELIUS. Biologische Untersuchungen über den Micrococcus Prodigiosus, Leipzig, 1887, S. 185.

14. — 23. — 35. — SCHRŒTTER. Ueber einige durch Bakterien gebildete Pigmente. Beiträge zur Biologie der Pflanzen. Hrsg. von F. Cohn 1872, Bd. I, H. 2, S. 109.

69. — SCHUMACKER. Ueber den Nachweis des Bakterienkerns u. seine chemische Zusammensetzung. Centralbl f. Bakt., I. Abt., Orig.-Bd. 97, H. 2/3, 1926.

9. — SEVENET J. Etude d'une bactérie chromogène nouvelle: Bac. Citrullus Sartoryi. Thèse Pharm. Strasbourg 1930.

86. — TOBIE. Le pigment de Bacillus Violaceus II. Prec. Soc. biol. Méd. 1936, 34, p. 620.

11. — VERNE J. Couleurs et pigments des êtres vivants. A. Collin, p. 141.

87. — VLES F. Spectrographie et spectrophotométrie ultraviolettes d'absorption avec le dispositif II. Arch. Phys. biol. XI, N° 2, p. 77—110, 1934.

46. — VOGES. Ueber einige im Wasser vorkommende Bakterien. Zeitschrift f. Bakt. 1893, Bd. 14, S. 301.

64. — VUILLEMIN. Genera Shizomycetum. Ann. de Mycologie, t. XI, 1913, p. 512.

78. — WALTHER A. Contribution à l'étude de l'Actynomycose pulmonaire. Thèse Pharm. Strasbourg 1936, p. 87.

71. — WEISS R. Contributions à l'étude de dermatomycoses tropicales de l'A. E. F. Thèse Pharm. Strasbourg 1935, p. 70.

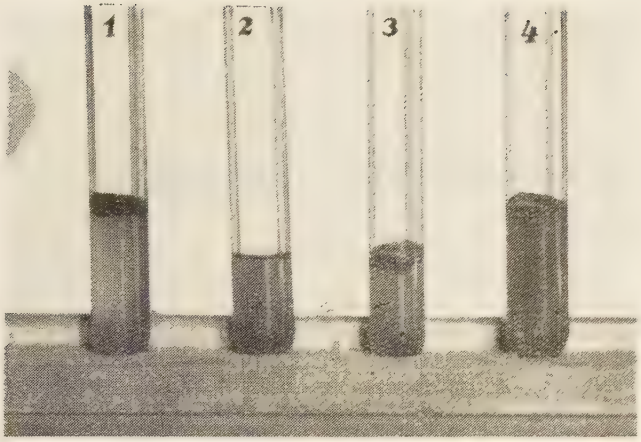
44. — WOOLLEY. Report on Bacillus Violaceus Manillae; a pathogenic microorganism. Bureau of Goverm. Labor 1904.

8. — 22. — WREDE et HETTSCHE. Ueber das Prodigiosin, der rote Farbstoff des B. Prodigiosus. Ber. d. Deutschen Chemischen Gesell. 1929, 62, S. 2678.

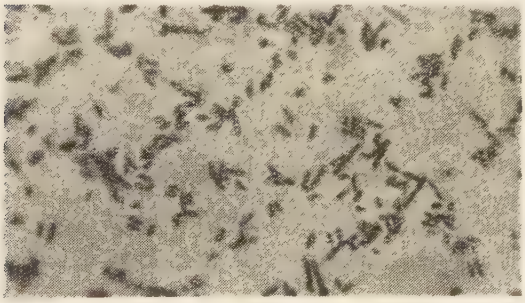
28. — WREDE et STRACK. Ueber das Pyocyanin, den blauen Farbstoff des B. Pyocyaneus. Zeitschr. f. physiol. Chem. 140, 1924, S. 1; 142, 1925, S. 103; 177, 1928, S. 177; 181, 1929, S. 58.

50. — ZIMMERMANN O. E. R. Die Bakterien unserer Trink- und Nutzwässer. Carl Brunner, Chemnitz, I 1890, S. 106; II 1894, S. 92.

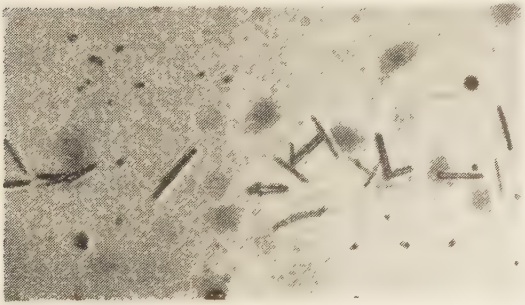
49. — ZOPF. Die Spaltpilze. 1895, Breslau. E. Trewendt. Bacter. Janthinum Zopf, S. 68.



1) Culture normale.
2) Race achromogène.
3) Race achromogène: récupération du pouvoir chromogène après un passage du p. d. t. glycerinée.
4) Race achromogène cultivée sur milieu dextriné.



Bacillus Violaceus, N. Sp. Sartoryi



Violacéine: aiguilles isolées.

Vu, Strasbourg, le 19 Mars 1938

Le Président du Jury

A. Sartory.

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 19 Mars 1938

Le Doyen
de la Faculté de Pharmacie

A. Sartory.

Vu et permis d'imprimer,

Strasbourg, le 22 Mars 1938.

Le Recteur de l'Académie de Strasbourg
Président du Conseil de l'Université

J. Dresch.

Table des Matières

Introduction 7

PREMIERE PARTIE

HISTORIQUE

Chapitre I:

Les principales bactéries chromogènes et leur pigment 11
A) Bacillus Prodigiosus 13
B) Bacillus Pyocyaneus 18
C) Bacillus Chlororaphis 25

Chapitre II:

Les différentes bactéries violettes 31
Bac. Violaceus Macé 1888 33
Chromobacter. Violaceum Bergonzoni 36
Bac. Laurentius Jordan 1890 37
Bac. Violarius Acetonicus Bréaudat 1906 38
Bacter. Cristallino Violaceum 39
Bac. Janthinus Zopf 40
Bac. Lilacinus Macé 41
Bac. Lividus Plagge et Proskauer 1887 42
Bac. Membranaceus Amethystinus Eisenberg 1891 43
— — — I 1913 44
— — — II Bampton 1913 44
Bac. Violet pathogène de Gauducheau 1907 46

Chapitre III:

Les pigments violets 47

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE BACILLUS VIOLACEUS SARTORYI

Chapitre I:

Origine 55
Aspect morphologique 55

Chapitre II:

Propriétés biologiques 65

Chapitre III:
Caractères culturaux 71
a) Milieux liquides 71
b) Milieux solides 73
c) Milieux synthétiques 75

Chapitre IV:
Propriétés biochimiques 77
Influence des éléments nutritifs 81

Chapitre V:
Etude du pouvoir chromogène 89

TROISIEME PARTIE

ETUDE DE LA SUBSTANCE CHROMOGENE

Chapitre I:
Généralités 95

Chapitre II:
Extraction du Pigment 97
Purification du Pigment 98

Chapitre III:
Propriétés physiques du pigment 103
Propriétés chimiques du pigment 104

Chapitre IV:
Analyse élémentaire de la Violacéine 107
Analyse spectrale 109

Conclusions générales 113

Notes bibliographiques 117

Figures 121